

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOLOGIA MOLECULAR



**Transformação genética de *Nicotiana tabacum* L. com genes
candidatos relacionados com a tolerância ao déficit hídrico**

MONIQUE DRIELLE GOMES FERREIRA

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Mai de 2014

MONIQUE DRIELLE GOMES FERREIRA

**Transformação genética de *Nicotiana tabacum* L. com genes
candidatos relacionados com a tolerância ao déficit hídrico**

**Dissertação apresentada à Universidade
Estadual de Santa Cruz, como parte das
exigências para obtenção do título de
Mestre em Genética e Biologia
Molecular**

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Maior de 2014

MONIQUE DRIELLE GOMES FERREIRA

Transformação genética de *Nicotiana tabacum* L. com genes candidatos relacionados com a tolerância ao déficit hídrico

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

APROVADA: 09 de maio de 2014

Dr^a Cláudia Fortes Ferreira
Embrapa CNPMF

Dr^a Sandra Regina de Oliveira Domingos
Queiroz
CEPLAC

Dr^a Luana Mahé Costa Gomes
UESC

Dr^a Fabienne Micheli
Cirad/UESC – Orientadora

F383

Ferreira, Monique Drielle Gomes.

Transformação genética de *Nicotiana tabacum* L. com genes candidatos relacionados com a tolerância ao déficit hídrico / Monique Drielle Gomes Ferreira. – Ilhéus, BA: UESC, 2014.

vii, 56 f. : il. ; anexos.

Orientadora: Fabienne Micheli.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular.

Inclui referências.

1. Engenharia genética vegetal. 2. Citros. 3. Expressão gênica. 4. Seca. I. Título.

CDD 631.5233

DEDICO

À minha Família.

“A persistência é o menor caminho do êxito”.

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

Agradecer é a forma mais singela e a mais nobre para demonstrar a gratidão e o reconhecimento pelo carinho e dedicação recebidos por todos esses anos.

A Universidade Estadual de Santa Cruz.

Ao programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular.

A Fapesb pela concessão da bolsa.

A professora Fabienne Micheli e Danielle Scotton pela orientação que foi essencial para a conclusão de mais uma etapa da minha vida acadêmica e profissional.

Á minha família pelo apoio e incentivo, principalmente a minha mãe, Mônica e meu padrasto José Eduardo. Sou grata por toda a educação, amor, compreensão e companheirismo que me foi dedicado. Á meu pai, Raimundo, por ter me proporcionado coisas maravilhosas, e entre elas é chegar onde estou. Graças a vocês hoje sou uma pessoa realizada. Á minha irmã, Erica pelo carinho e apoio. Amo vocês!!!

Aos meus amigos de longas datas e aos amigos que conquistei na família Biomol.

A Jacqueline que por tantas vezes me auxiliou e me mostrou o melhor caminho para obter os resultados tão almejados. Meu verdadeiro anjo da guarda.

Ao pessoal do laboratório em especial: Sara, Edson, Emanuelle, Cristina, Luana, por toda ajuda e solidariedade. Os momentos de descontração e desespero por nós compartilhados, foram para mim uma demonstração de estima.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente me ajudaram a chegar até aqui e continuaram me incentivando na busca de novos horizontes.

A vocês um beijo carinhoso e o meu muito obrigada.

ÍNDICE

EXTRATO	ii
ABSTRACT	iii
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITTERATURA	4
2.1. A citricultura: visão geral das restrições nos pomares brasileiros	4
2.2. Respostas das plantas a deficiência hídrica	6
2.3. HVA22.....	9
2.4. PR-10 (proteína relacionada a patogênese 10)	11
3. OBJETIVOS.....	13
4. MATERIAL E METODOS.....	14
4.1. Identificação e amplificação dos genes de citros relacionados com estresse hídrico ...	14
4.2. Clonagem do cDNA <i>HVA22</i> em vetor de transformação de plantas	16
4.3. Sequenciamento do cDNA <i>HVA22</i>	17
4.4. Análise filogenética de <i>HVA22</i>	18
4.5. Transformação de plantas com <i>HVA22</i> e <i>TcPR10</i>	18
4.5.1. Material vegetal	18
4.5.2. Cultura e manutenção dos isolados de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	19
4.5.3. Transformação genética de tabaco, regeneração e aclimação	19
4.6. Caracterização das plantas transgênicas com a construção <i>35S::TcPR10</i>	20
4.6.1. Extração de DNA genômico e análise da inserção dos genes por PCR	21
4.6.2. Análises fisiológicas	21
4.6.2.1. Análise da perda do conteúdo de água	21
4.6.2.2. Detecção de H_2O_2	22

4.6.2.3. Aplicação do estresse hídrico	22
4.6.2.4. Medição das trocas hídrico foliar	23
4.6.2.5. Medição do potencial gasosas foliares	23
4.7. Delineamento experimental e análise estatística	23
5. RESULTADOS	25
5.1. Identificação e obtenção de genes de citros relacionados com tolerancia a estresse hídrico	25
5.2. Estudo do gene <i>HVA22</i> de <i>C. clementina</i>	27
5.2.1. Análise da sequencia <i>HVA22</i>	27
5.2.2. Análise filogenética	28
5.2.3. Clonagem molecular do gene <i>HVA22</i> e introdução em vetor de transformação de plantas	29
5.2.4. Sequenciamento do gene <i>HVA22</i>	29
5.2.5. Transformação de plantas de tabaco com o gene <i>HVA22</i>	29
5.3. Estudo do gene <i>TcPR-10</i>	31
5.3.1. Transformação genética de tabaco com o gene <i>TcPR-10</i> , regeneração e aclimatação	31
5.3.2. Confirmação da transformação das plantas de tabaco com a construção <i>35S::TcPR-10</i>	32
5.3.3. Análise de tolerância a estresse por desidratação em linhagens transgênicas de tabaco	32
5.3.4. Acúmulo de H_2O_2	33
5.3.5. Trocas gasosas	35
6. DISCUSSÃO	38
6.1. Gene <i>HVA22</i>	38
6.2. Gene <i>TcPR-10</i>	39
7. CONCLUSÕES	43
8. REFERÊNCIAS	44
9. ANEXOS	54

EXTRATO

FERREIRA, Monique Drielle Gomes. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, maio 2014. **Transformação genética de *Nicotiana tabacum* L. com genes candidatos envolvidos na tolerância ao déficit hídrico.** Orientadora: Fabienne Micheli (Cirad/UESC). Co-orientadores: Abelmon da Silva Gesteira (Embrapa) e Danielle Scotton (UESC).

O Brasil se destaca por ser o maior produtor mundial de laranja, possuindo assim uma expressividade econômica na citricultura. Isso se deve às boas condições climáticas que o país oferece para a prática dessa cultura. Os estados de São Paulo e Bahia são os principais produtores dessa cultura, mas vem sofrendo perdas na sua produtividade devido a interferência de fatores bióticos e abióticos. Entre os fatores abióticos, o déficit hídrico é um dos principais responsáveis pela perda na produtividade da citricultura. No Nordeste brasileiro, região de alta produtividade, por exemplo, a citricultura está situada em locais de solo extremamente duros quando secos, de pequena profundidade, afetando assim a disponibilidade de água no solo. O uso de irrigação na citricultura ainda é pequeno, principalmente devido aos custos da implantação. Um outro fator que torna a citricultura brasileira vulnerável a seca é a variedade limitada de porta-enxertos, já que a principal forma de propagação dessa cultura é por enxertia. Atualmente, o porta-enxerto mais utilizado por apresentar características desejáveis em relação a estresse bióticos e abióticos, é o limoeiro ‘Cravo’ (‘Rangpur lime’). Mas por sua vez, o limoeiro ‘cravo’ apresenta suscetibilidade a algumas doenças, necessitando assim de novas combinações de porta-enxertos. Diante da condição de déficit hídrico, as plantas apresentam mecanismos para tolerar essa condição, e entre esses mecanismos está à expressão de genes que irá auxiliar na resposta da planta frente ao fator de estresse. O presente estudo teve por objetivo analisar a superexpressão dos genes *HVA22* e *TcPR-10* em relação a tolerância ao estresse hídrico por transformação de plantas de tabaco. Análise de bioinformática demonstrou que o gene *HVA22* contém uma matriz de

leitura aberta (ORF) de 435 pb, que codifica uma proteína de 144 aminoácidos contendo dois domínios transmembranares. Esta proteína é ortóloga com membros da família de HVA em *Arabidopsis thaliana* (*AtHVA22d* e *AtHVA22e*) que são genes relacionados com o crescimento reprodutivo e transporte vesicular. O gene *HVA22* de *C. clementina* foi clonado em vetor de expressão de planta pCAMBIA2301 sob controle do promotor CaMV35S e foi utilizado para transformação de plantas de tabaco. As plantas estão na etapa de regeneração e serão avaliadas futuramente. Em paralelo, experimento de transformação genética com o gene *TcPR-10* (construção obtida em trabalho previo) mediada por *Agrobacterium tumefaciens* permitiu a obtenção de 5 linhagens transgênicas de tabaco. Para validar que a superexpressão desse gene está envolvida no processo de tolerância ao déficit hídrico, foi realizado um ensaio de desidratação com discos foliares das linhagens transgênicas (em comparação com plantas controles) e avaliado quanto à perda do conteúdo de água e acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS). Através dos resultados obtidos foi possível mostrar que as plantas transgênicas perderam significativamente menos água e acumularam menos ROS do que as plantas controles não-transformadas. Ensaio de estresse também foi realizado, onde durante dez dias as plantas transgênicas e a controle não-transformada (NT) foram submetidas ao déficit hídrico gradativamente. Foi observado que mesmo em condição de estresse as plantas transgênicas mantiveram seus níveis de condutância estomática, taxa fotossintética e transpiração elevadas quando comparados ao controle NT. Os resultados obtidos no presente estudo confirmam o potencial do gene *TcPR-10* na resposta de tolerância da planta a estresse hídrico, sendo um forte candidato para a utilização na transformação de porta-enxertos de citros.

Palavras-chave: Citros; engenharia genética; estudo funcional; expressão gênica; seca.

ABSTRACT

FERREIRA, Monique Drielle Gomes. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, May 2014. **Genetic transformation of *Nicotiana tabacum* L. with candidate genes involved in drought tolerance.** Advisor: Fabienne Micheli (Cirad/UESC). Co-advisores: Abelmon da Silva Gesteira (Embrapa) and Danielle Scotton (UESC).

Brazil is the main orange producer worldwide, and for this reason plays an important role in the citrus culture. This situation is due to the good climatic conditions that Brazil offers for the culture practices. Even if the São Paulo and Bahia States are the main citrus producers, they suffer lacks in the productivity due to the interference of biotic and abiotic factors. Among the abiotic factors, drought is one the main responsible for the lack of citrus productivity. For example, in the Brazilian Nordeste, highly productive region, the citrus orchards are located in shallow and extremely hard soils, affecting the soil water availability. The use of irrigation in the citriculture is still reduced, mainly due to the high cost to implement such technique. Another factor that places the citriculture in a vulnerable position in relation to drought is the limited variety of rootstocks; since the main propagation form of citrus is made by grafting. Today, the more used rootstock because of its interesting characteristics in relation to biotic and abiotic stresses is the ‘Rangpur lime’. However, the ‘Rangpur lime’ presents susceptibility to some diseases, and new combinations of rootstocks are necessary. To tolerate drought, the plants develop some mechanisms, and among them, the expression of genes that could support the plant defense response to stress factors. The aim of the present study is to analyze the superexpression of the *HVA22* and *TcPR-10* genes in relation to drought tolerance by transformation of tobacco plants. Bioinformatics showed that the *HVA22* gene of *C. clementina* has a 435 pb ORF that encoded a protein of 144 amino acids containing two transmembrane domains. This protein is ortholog to members *HVA* from *Arabidopsis thaliana* (*AtHVA22d* and *AtHVA22e*) that are involved in reproductive growing and vesicular transport. The *HVA22* gene from *C. clementina* was cloned in the

expression vector for plant pCAMBIA2301 under the control of the CaMV35S promoter and was used for tobacco transformation. The transformed plants are under regeneration and will be evaluated in brief. In parallel, genetic transformation of tobacco made with the *TcPR-10* gene (construction previously obtained) mediated by *Agrobacterium tumefaciens* allowed the obtaining of 5 tobacco transgenic lines. To validate if the superexpression of this gene is involved in the tolerance to drought, we realized a dehydration assay using leaf discs from the tobacco transgenic lines (comparing to control – non transformed plants) and we evaluated the reduction of water content as well as the accumulation of reactive oxygen species (ROS). We showed that the transgenic plants loose significantly less water and accumulates less ROS than the control plants. Drought stress was also applied to the plants: during ten days the transgenic and control plants were submitted to gradual water restriction. We observed that, even in drought condition, the transgenic plants maintained high level of stomata conductance, and photosynthetic and transpiration ratio in comparison to the non transformed controls. These data confirm the potential of *TcPR-10* in response to drought in tobacco, and place this gene as a strong candidate for citrus rootstock transformation.

Keywords: Citros; Genetic engineering; functional study; plant transformation; drought.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Função dos genes de tolerância induzidos em resposta ao déficit hídrico..... 8
- Figura 2.** Esquema da região do T-DNA do vetor binário pCAMBIA2301 modificado, indicando os genes presentes no vetor e o sítio múltiplo de clonagem sob o controle do promotor CaMV35S 17
- Figura 3.** Esquema do procedimento de transformação de plantas com *Agrobacterium tumefaciens* 20
- Figura 4.** Plantas de tabaco transformadas e controles em casa de vegetação durante o período de avaliação do experimento 23
- Figura 5.** Amplificação de seis genes candidatos a partir do gDNA de *C. clementina* (teste dos primers) 25
- Figura 6.** Amplificação de cinco genes candidatos a partir do cDNA de *C. clementina* 26
- Figura 7.** Sequência nucleotídica e protéica de *HVA22* de *C. clementina* 27
- Figura 8.** Predição de domínios transmembranar da proteína *HVA22* de *C. clementina* 27
- Figura 9.** Análise filogenética das proteínas da família *HVA22* de *A. thaliana*, laranja, clementina e barley 28

Figura 10. Confirmação da subclonagem de HVA22 em pUC118/CaMV35S por PCR.....	29
Figura 11. Alinhamento das sequencias do cDNA <i>HVA22</i> oriundo do banco de dados e utilizado para desenho dos primers (n° de acesso C31106H02) e oriundo do sequenciamento após clonagem em pGEM-T.....	30
Figura 12. Transformação de plantas de tabaco com o gene <i>HVA22</i>	30
Figura 13. Etapas de transformação e regeneração de tabaco com o gene <i>TcPR-10</i>	31
Figura 14. Extração de DNA de 10 plantas aleatórias transformadas com a construção 35:: <i>TcPR10</i>	32
Figura 15. Confirmação da transformação por PCR utilizando primers específicos do promotor 35S.....	32
Figura 16. Taxa de desidratação de discos foliares da planta controle não-transformada, transformada com plasmídeo 3301 e linhagens transgênicas (L21, L25 L12 e L26) sob estresse durante 270 min em temperatura ambiente.....	34
Figura 17. Produção de peróxido de hidrogênio em tecido foliar de <i>N. tabacum</i> inoculado com HCl-DAB (1 mg.mL ⁻¹).....	34
Figura 18. Condutância estomática (<i>gs</i>) medidas após o periodo de aplicação do estresse...	35
Figura 19. Taxa fotossintética (<i>A</i>) medida após o periodo de aplicação do estresse.....	36
Figura 20. Transpiração (<i>E</i>) medidas após o periodo de aplicação do estresse.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Genes identificados por Allario <i>et al.</i> (2012) e utilizados para o presente estudo .	15
Tabela 2. Resumo da amplificação dos genes e cDNA de setes genes candidatos escolhidos a partir do estudo de Allario <i>et al.</i> (2013).....	26
Tabela 3. Diferença média na taxa de desidratação das linhagens transgênicas e da planta controle, entre os tempos de 0 a 270 minutos.....	33

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Citrus* e os gêneros afins *Fortunella* e *Poncirus*, que pertencem à família Rutaceae, são nativos do sudeste do continente asiático (DONADIO *et al.*, 2005). Mesmo não sendo o seu centro de diversidade para essa cultura, o Brasil oferece boas condições climáticas para o crescimento e produção de plantas cítricas, tornando-se um dos maiores produtores mundiais (DONADIO *et al.*, 2005). No cenário internacional, o Brasil ocupa uma posição de destaque, sendo o maior produtor de laranja, produzindo aproximadamente 19,4 milhões de toneladas de frutos em uma área aproximada de 856 mil hectares (MAPA, 2011). Segundo Neves (2010), o Brasil também é o maior exportador mundial de suco de laranja concentrado e congelado. Dentre os estados brasileiros, a Bahia se destaca como segundo maior produtor de laranja (6,2%), estando atrás apenas do estado de São Paulo (70,2%) (IBGE, 2013). Esta cultura é apontada como principal responsável pelo crescimento da fruticultura brasileira (FAO, 2010; IBGE, 2009).

Apesar da expressividade econômica da citricultura no Brasil e no mundo, o setor citrícola vem sofrendo perdas na produtividade, fenômeno que pode ser atribuído a fatores bióticos (pragas e doenças) e abióticos, como o estresse hídrico (ORTOLANI *et al.*, 1991; GMITTER *et al.*, 2007). Dentre os fatores abióticos, na região nordeste do Brasil, é observado um cenário de deficiência hídrica no solo, onde a citricultura situa-se numa região geográfica de cultivo conhecida como Grande Unidade de Paisagem de Tabuleiros Costeiros caracterizado por horizontes coesos, extremamente duros quando secos e geralmente com pequena profundidade, que influencia na dinâmica da água no perfil do solo (PAIVA *et al.*, 1998; CINTRA *et al.*, 2000; SOUZA *et al.*, 2004). Previsões feitas a partir de modelos ecológicos globais, mostraram que as mudanças climáticas tendem a afetar com maior severidade as regiões tropicais e subtropicais (IPCC, 2001). Com isso, há uma expectativa de que as deficiências hídricas tornem-se mais acentuadas ao longo do tempo, resultando em efeitos adversos para a agricultura

(MEARNS *et al.*, 1997). A maioria das regiões citrícolas do país apresentam um volume adequado de chuvas para a cultura, estimada entre 600 e 1300 mm anuais (VIEIRA, 1991; SENTELHAS *et al.*, 2005), mas a distribuição pluviométrica é bastante irregular. Assim, períodos prolongados de seca prejudicam o desenvolvimento da cultura, como a estiagem observada entre agosto e outubro de 2007, que levou à redução de 30% a 40% na produção de variedades precoces no estado de São Paulo (VIANA; BRAGA, 2007). Apesar da incidência de déficits temporários nas regiões citrícolas (CERQUEIRA *et al.*, 2004), o uso de irrigação é ainda pequeno, principalmente devido aos custos da implantação de tais sistemas (ORTOLANI *et al.*, 1991).

Mecanismos complexos envolvem os aspectos moleculares da resposta adaptativa à seca, onde a percepção do estresse regula uma cascata de eventos que podem ser ativados ou desativados (BRAY, 1993). Muitos genes respondem à seca pela regulação transcricional e seus produtos atuam na resposta e tolerância ao déficit hídrico (SHINOZAKI *et al.*, 2003). Para a obtenção de plantas tolerantes ao estresse, a manipulação de genes com função de proteger e manter as funções celulares ou que estão envolvidos na manutenção da estrutura de componentes celulares tem sido o alvo principal dos programas de melhoramento (VALLIYODA; NGUYEN, 2006). Esses genes podem codificar duas classes de proteínas, as regulatórias e as funcionais. Dentre as proteínas funcionais, estão os fatores de proteção de macromoléculas e em proteínas regulatórias, estão os genes envolvidos na biossíntese do ABA.

O melhoramento de citros visando a tolerância ao déficit hídrico, encontra dificuldades devido ao comportamento reprodutivo e genético (alta heterozigosidade, incompatibilidade intra e inter-específica, esterilidade parcial ou completa do pólen, poliembrião, apomixia e longo ciclo reprodutivo). Devido isso, a execução de programas convencionais de melhoramento de citros muitas vezes se torna inviável. Sendo assim, a utilização de técnicas biotecnológicas como cultura de tecidos e transformação genética têm oferecido novas alternativas para o melhoramento da espécie (GROSSER; GMITTER, 2000; ALMEIDA *et al.*, 2003; SINGH; RAJAM, 2009). Em particular, a engenharia genética é uma importante ferramenta que envolve transformação de células e posterior regeneração *in vitro* de plantas com características de interesse, utilizadas para o aumento da variabilidade genética da espécie (TORRES *et al.*, 1998). Assim, o estudo funcional de genes, por meio da transformação de plantas – principalmente em plantas modelo – permite a investigação do papel que estes genes

desempenham, bem como a validação da sua função nos mecanismos que regulam a resposta adaptativa ao estresse hídrico.

Nos últimos dois anos, um grupo de pesquisadores do *Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement* (Cirad, França) iniciou trabalhos com porta-enxertos de ‘limoeiro Cravo’ (*Citrus limonia* Osbeck), enxertados com laranjeira ‘Valência’ (*C. sinensis* (L.) Osbeck). Foi encontrado um conjunto de genes superexpressos na condição de déficit hídrico (ALLARIO *et al.*, 2012). Tais genes podem estar envolvidos em vias de resposta metabólica à seca, como na proteção de membranas celulares, redução do acúmulo de espécies reativas de oxigênio e osmorregulação. Um outro grupo de pesquisadores investigaram genes expressos, inicialmente associados à resposta de infecção por patógeno, os quais codificam as Proteínas Relacionadas à Patogênese (Pathogenesis Related Proteins) (VAN LOON E VAN SERIEN, 1999; VAN LOON *et al.*, 2006, MUTHUKRISHNAN *et al.*, 2001). No entanto, diferentes condições de estresse, como por exemplo o déficit hídrico, podem resultar na superexpressão destes genes PR (PARK *et al.*, 2004), mas é necessário estudos que esclareçam a funcionalidade deles em situação de seca.

Por tudo isso exposto, o presente trabalho objetivou, por meio de transformação de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), realizar um estudo funcional dos genes HVA22 de citros e PR-10 de cacau (*TcPR-10*), relacionados à tolerância ao déficit hídrico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A citricultura: visão geral das restrições nos pomares brasileiros

O gênero *Citrus* e os gêneros afins *Poncirus* e *Fortunella* pertencem à família Rutaceae (SWINGLE E REECE, 1967). Dados sugerem que os citros são originários do sul da Ásia, mais provavelmente da China. No ano de 1500, através da expedição de Cristóvão Colombo, os citros chegaram ao Brasil, onde encontraram condições favoráveis para se desenvolver melhor do que no centro de diversidade (DONADIO *et al.*, 2005). Os citros podem ser divididos em laranjeiras doce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), tangerineiras (*Citrus reticulata* Blanco), limoeiros (*Citrus limon* (L.) Buen. F.), limeiras ácidas [*Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle e *Citrus latifolia* (Yu. Tanaka)], pomeleiros (*Citrus paradisi* Macf.) e outros (PIO *et al.*, 2005). As espécies e seus híbridos mais utilizadas como porta-enxertos são o limoeiro ‘Cravo’ (*C. limonia* Osbeck), limoeiro ‘Volkameriano’ (*C. volkameriana* V. Ten. & Pasq.), tangerineira ‘Sunki’ (*C. sunki* hort. ex Tanaka), tangerineira ‘Cleopatra’ (*C. reshni* hort. ex Tanaka), laranjeira azeda (*C. aurantium* L.) e citrumeleiro ‘Swingle’ [*C. paradisi* Macf. cv Duncan x *P. trifoliata* (L.) Raf.] (POMPEU JUNIOR, 2005).

Os métodos de multiplicação dos citros podem ser por sementes (via sexual), por alporquia, estaquia e enxertia (via assexual). A forma de propagação mais comum dessa cultura é a enxertia, que consiste na associação entre dois indivíduos com características genéticas diferentes que passam a compartilhar benefícios para a produção de uma nova planta que possua uma alta produtividade e longevidade. Esse método apresenta algumas vantagens, entre as quais se destacam a uniformidade das mudas, alta quantidade de sementes, precocidade no início de produção e aumento na produtividade. Além disso, se obtém mudas idênticas à planta-mãe com características de interesse, como maior resistência ou tolerância a condições desfavoráveis de clima, solo, pragas e doenças, a depender do porta-enxerto e/ou da combinação utilizada (POMPEU

JUNIOR, 2005). O porta-enxerto influencia a variedade copa em algumas características, como a indução da produção precoce, fertilidade do pólen, permanência dos frutos na planta e sua conservação após a colheita, bem como na maturação dos frutos, coloração da casca e do suco, teor de açúcares, ácidos e outros componentes do suco, síntese de nutrientes, composição química das folhas, absorção de nutrientes, transpiração, respostas a produtos de abscisão dos frutos e folhas, tolerância a estresses bióticos (pragas e doenças) e estresses abióticos (salinidade e seca) (MATTOS *et al.*, 2003). Para iniciar estudos de porta-enxertos, o conhecimento do comportamento da associação entre a variedade copa e o porta enxerto é essencial. Uma maneira para atender essa condição é a utilização de porta-enxertos originados de sementes nucelares, onde os embriões nucelares são formados pela diferenciação de células somáticas do núcleo e possui o mesmo genoma da planta-mãe, dando origem a plantas idênticas àquelas que forneceram a semente (POMPEU JUNIOR, 2005; MOREIRA *et al.*, 2010).

Nos pomares brasileiros, por volta de 1910, o porta-enxerto mais utilizado era a ‘laranja caipira’. Contudo, foi afetado pela gomose, doença causada por *Phytophthora* spp. e foi substituído pela ‘laranja azeda’. No ano de 1937, o vírus da tristeza dos citros (CVC) atingiu os citros enxertados em ‘laranjeira azeda’, e de novo, o controle passou a ser efetuado através da utilização de novos porta-enxertos. Assim, sucessivamente e por causa da base genética estreita utilizada em plantios comerciais associada às condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento de várias doenças e pragas, os patógenos assolaram os pomares brasileiros. No ano de 1957, a citricultura brasileira sofreu com o ataque do cancro cítrico, causada por *Xanthomonas citri subsp.* Em 1987 a clorose variegada do citros, causada pela bactéria *Xylella fastidiosa* atingiu os pomares. Em 1999, a morte súbita do citros (MSC), e em 2004, o Huanglongbing (HLB), conhecido popularmente como *greening*, doença causada pela bactéria *Candidatus Liberibacter* (MATTOS *et al.*, 2005; POMPEU JUNIOR, 2001; COLETTA-FILHO *et al.*, 2004) também tiveram efeitos devastadores no pomares, principalmente no estado do Paraná, Minas Gerais e em toda a área citricula do estado de São Paulo (BELASQUE Jr. *et al.*, 2010).

Hoje, o porta-enxerto mais utilizado por apresentar características desejáveis em relação a estresse bióticos e abióticos, é o limoeiro ‘Cravo’ (‘Rangpur lime’); na década de 60 era o único porta-enxerto utilizado na citricultura paulista (POMPEU JÚNIOR, 2001). O limoeiro ‘Cravo’ é considerado um híbrido natural entre limoeiro e tangerineira, apresenta média resistência às gomoses de *Phytophthora parasitica* e

Phytophthora citrophthora, sendo suscetível a nematóides (*Tylenchulu semipenetrans* e *Pratylenchus jaehni*), tolerante ao vírus da tristeza dos citros, suscetível ao declínio do citros e tolerante à seca. Apresenta melhor desempenho quando plantado em solos arenosos e profundos, mas pode induzir produtividade inferior à das tangerineiras ‘Cleópatra’ e ‘Sunki’ quando plantado em solos argilosos. Com o surgimento da MSC, que afeta laranjeiras e tangerineiras enxertadas em limoeiro ‘Cravo’ e ‘Volkameriano’, ocorreu, uma nova aceleração na busca pela diversificação de porta-enxertos. Assim, surgiu a busca por novos porta-enxertos viáveis para o uso comercial, visando, principalmente combater a vulnerabilidade fitossanitária. Pompeu Junior (2001) revisou as possibilidades das novas variedades indicadas como promissoras, dentre elas a tangerineira ‘Cleópatra’ e o citrumeleiro ‘Swingle’. Diante dessa situação é importante a ampliação da base genética de variedades de copas e porta-enxertos, e isso já tem sido uma constante discussão e foco de trabalho para o aumento da produtividade (MACHADO *et al.* 2005).

Outro fator que afeta negativamente a produtividade dos citros são os estresses abióticos, entre eles, o estresse por seca, que diminui o crescimento vegetativo, provoca abortamento de frutos jovens, redução no desenvolvimento e qualidade interna e externa dos frutos, causando importantes perdas econômicas em pomares (PÉREZ-PÉREZ *et al.*, 2009; RODRÍGUEZ-GAMIR *et al.*, 2010). Segundo Magalhães Junior (2010), a seleção de genótipos que apresentem mutações ou recombinações nos genes envolvidos na tolerância a estresses abióticos é fundamental, pois se estas diferenças forem expressas em melhoria, sendo possível que esses genes sejam transferidos para cultivares comerciais, possibilitando a obtenção de genótipos mais produtivos.

2.2. Respostas das plantas à deficiência hídrica

Para tolerar o estresse hídrico, a planta induz uma série de respostas, dentre elas as fisiológicas e as bioquímicas. Entre essas respostas estão o fechamento estomático, a repressão do crescimento celular e também da fotossíntese e ativação da respiração. A quantidade de água necessária para a manutenção da planta é determinada em grande parte pela taxa de transpiração. Como resposta à deficiência hídrica no solo, o potencial hídrico foliar é reduzido para, dessa maneira, criar um gradiente necessário para manter o fluxo de água proveniente do solo. Quando o potencial hídrico iguala ao potencial

osmótico, os estômatos foliares se fecham, reduzindo assim a transpiração (KERBAUY, 2004).

Na condição de deficiência hídrica na planta, desencadeia a produção do fitohormônio ácido abscísico (ABA), que está relacionado com alguns mecanismos de resposta como o fechamento estomático e a indução de genes relacionados ao estresse. O mecanismo de ação do ABA é no fechamento dos poros estomáticos, evento que ocorre devido ao aumento na concentração do íon Ca^{2+} e subsequente ativação dos canais iônicos situados na membrana plasmática (HAMILTON *et al.*, 2000; PEI *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2001; KOHLER; BLATE., 2002). Com esse mecanismo, ocorre a despolarização das células-guarda, efluxo de K^+ e perda de turgor, que, por consequência permite o aumento do volume das células-guarda que promove o fechamento estomático (BLATT, 2000; MACROBBIE, 2000; SCHROEDER *et al.*, 2001). Quando a abertura estomática diminui, a perda de vapor d'água pela planta através da transpiração é reduzido ou limitado. A abertura estomática também é afetada pelo o ambiente circundante, os efeitos do potencial hídrico do solo, da temperatura e umidade relativa do ar, da radiação total incidente e da temperatura da folha (DAMATTA *et al.*, 2005). O ABA também é fundamental para o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), que atuam como sinalizadores intermediários no fechamento estomático (PEI *et al.*, 2000; MURATA *et al.*, 2001; SCHROEDER *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 2001).

A condição de seca também pode provocar alterações morfológicas. Como resposta primária a essa condição, está a paralisação do crescimento da parte aérea, ocasionando a inibição da emissão de novas folhas ou também, em situação mais drástica, a abscisão foliar. Esse mecanismo é eficiente na economia de água, por diminuir a superfície de transpiração e aumentar a eficiência do uso da água (DAMATTA *et al.*, 2003). Ao contrario da parte aérea, sob condições de seca, ocorre estímulo para o crescimento radicular (PINHEIRO *et al.*, 2005), favorecendo a busca de água em regiões mais profundas do solo onde a água é mais abundante (RODRÍGUEZ-GAMIR *et al.*, 2010).

Além das respostas fisiológicas, bioquímicas e morfológicas, existem mecanismos de resposta celular e molecular. O acúmulo de osmólitos e proteínas, família LEA por exemplo, fazem partes dessas respostas. A indução de uma variedade de genes que podem ser reprimidos ou superexpressos também está envolvida no processo de tolerancia a deficiência hídrica das plantas (SHINOZAKI *et al.*, 2003;

SHINOZAKI e YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007; BARTELS e SUNKAR, 2005; YAMAGUCHI-SHINOZAKI e SHINOZAKI, 2005). O estresse promove a ativação de complexos enzimáticos, sendo resultado de alterações conformacionais na membrana celular, promovendo uma cascata de eventos moleculares e que resultam na indução de vários genes que atuam na proteção das funções celulares (SHINOZAKI e YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007) (Figura 1).

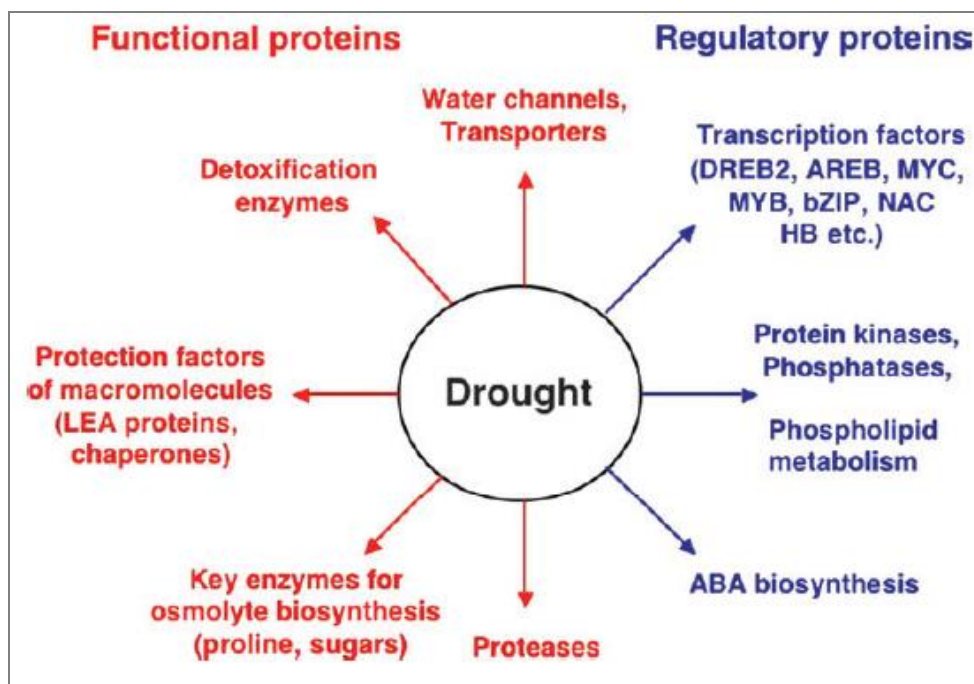


Figura 1. Função dos genes de tolerância induzidos em resposta ao déficit hídrico. Fonte: Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki (2007).

Genes relacionados com estresse a seca codificam, entre outras, enzimas chaves que regulam a biossíntese de solutos compatíveis, tais como aminoácidos (prolina), compostos quaternários (aminas e poliaminas, glicinabetaína), além de uma variedade de açúcares e álcoois de açúcar (manitol, trealose, galactinol e rafinose) (UMEZAWA *et al.*, 2006). Além disso, existem genes ABA dependentes cuja expressão é induzida por tratamento com ABA exógeno, e genes ABA independentes cuja expressão não é alterada pela adição de ABA exógeno (YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2005). A função de alguns destes genes e a sua relação com tolerância a estresse hídrico foi demonstrada através da obtenção de plantas transgênicas (ZHANG *et al.*, 2004; BARTELS; SUNKAR, 2005; UMEZAWA *et al.*, 2006). Dentro dos genes que podem

ser utilizados em estratégias biotecnológicas para aumentar a tolerância das plantas a déficit hídrico, encontram-se o gene de HVA22 e o gene PR-10.

2.3. HVA22

O gene HVA22 foi primeiramente isolado de células de aleurona de cevada (*Hordeum vulgare*) tratada com ABA, que codifica uma proteína de 130 aminoácidos (SHEN *et al.*, 1993). A camada de aleurona é um tecido onde enzimas hidrolíticas são sintetizadas e secretadas no intuito de quebrar as reservas armazenadas no endosperma, como o amido, durante as fases iniciais do crescimento das mudas (FILNER e VARNER, 1967; EASTMOND E JONES, 2005). O mRNA de HVA22 acumula-se gradualmente na camada de aleurona durante a fase final de maturação da semente (SHEN *et al.*, 2001). Estudos da expressão do gene HVA22 durante o desenvolvimento e germinação da semente revelaram que tanto o acúmulo ou a degradação do mRNA de HVA22 está relacionado com o estado de dormência da semente. A expressão deste gene é observada em embriões e camadas de aleurona, mas não é observada no endosperma, sugerindo que HVA22 é regulado pelo ABA durante a manutenção da dormência das sementes. O gene HVA22 pode funcionar em outros órgãos e tecidos além de sementes, como mudas de brotos e raízes quando tratadas com ABA, ou submentidas ao frio e seca (SHEN *et al.*, 2001).

Estudos utilizando homólogos de HVA22 de *Saccharomyces cerevisiae* (Yop1p) e *Xenopus* (DPI) revelaram que estes genes apresentam, possivelmente, um papel no tráfico vesicular e transporte do retículo endoplasmático (RE) para o complexo de Golgi em levedura (YANG *et al.*, 1998; CALERO *et al.*, 2001; DE ANTONI *et al.*, 2002). Além disso proteínas Yop1p/DPI seria interagir com proteínas do RE, as *Reticulon* (Rtn4/NogoA), para moldar *in vivo* a rede do RE (VOELTZ *et al.*, 2006; HU *et al.*, 2008). Foi mostrado que o gene HVA22 e seus homólogos contêm duas sequências conservadas que podem ser fosforiladas por uma caseína quinase II (CKII) (SHEN *et al.*, 2001). Em *Arabidopsis* (ESTs e genoma), foram identificados cinco homólogos de HVA22, designados *AtHVA22a*, *AtHVA22b*, *AtHVA22c*, *AtHVA22d* e *AtHVA22e*, cuja expressão foi observada como sendo tecido-específico e como sendo regulada diferencialmente por tratamento com ABA e condições de estresse (CHEN *et al.*, 2002). Estes resultados sugerem que os genes *AtHVA22* podem ter uma função fisiológica

distinta em diferentes tecidos. Observou-se também que os genes *AtHVA22* estão presentes em uma única cópia no genoma e que a similaridade entre as sequências de cDNA dos cinco genes *AtHVA22* é baixa, variando de 30% a 49%. Análise filogenética mostrou que a origem desses genes é monofilética (CHEN *et al.*, 2002).

De forma geral, análises de bioinformática identificaram cerca de 350 homólogos de *HVA22* que estão presentes em organismos eucarióticos, como plantas, musgos, levedura e mamíferos, mas nenhum homólogo em procarionto. Os homólogos de *HVA22* possuem sequências de aminoácidos conservadas similares com o TB2/DP1 (GUO & HO, 2008). Em citros, um estudo de expressão gênica por microarranjo (contendo 21080 unigenes; Martínez-Godoy *et al.*, 2008) e RT-qPCR foi efetuado em folhas de porta-enxertos limoeiro 'Cravo' (*Citrus limonia*) diplóides (2x) e autotetraplóides (4x) enxertados com laranja doce Valencia (*Citrus sinensis*) 2x, chamados V/2xRL e V/4xRL, respectivamente, e avaliados quanto a tolerância à seca. Para avaliar o estresse foram utilizadas seis plantas de V/2xRL e seis V/4xRL como controle e seis plantas de V/2xRL e seis V/4xRL como plantas estressadas, a rega foi suspensa por 11 dias (ALLARIO *et al.*, 2013). Assim, foram identificados genes diferentemente expressos em folhas das plantas estressadas V/2xRL e V/4xRL; estes genes têm funções associadas com a fotossíntese, desintoxicação, parede celular, biossíntese da cutícula. Dentre eles encontra-se o gene *HVA22* foi encontrado em folhas das plantas estressadas V/2xRL e V/4xRL.

O gene *HVA22* de citros foi descoberto na França por Allario e colaboradores (2012) do Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), através de um estudo com microarranjo de cDNA de 21080 unigenes putativos gerado do Projeto Genoma Funcional de Citrus, descrito no trabalho de Martínez - Godoy *et al.* (2008).

O estudo do gene *HVA22* mostrou a sua indução frente a estresses ambiental como desidratação, salinidade, temperaturas extremas e pelo hormônio ABA (ALLARIO *et al.*, 2012). O potencial deste gene em conferir tolerância ao déficit hídrico já foi demonstrado por Su *et al.* (1998), em plantas transgênicas de arroz estressadas por déficit hídrico e NaCl ocorrendo uma alta expressão do gene *HVA22* nas folhas e raízes, respectivamente. Isso indica uma possível participação desse gene na tolerância tanto a seca quanto à salinidade.

2.4. PR-10 (proteína relacionada a patogênese 10)

As proteínas relacionadas à patogênese (PR), são proteínas vegetais induzidas em resposta a infecção por patógeno ou sob diferentes condições de estresse. Também podem ser expressas em tecido ou estágio de desenvolvimento específico (VAN LOON E VAN SERIEN, 1999; VAN LOON *et al.*, 2006, MUTHUKRISHNAN *et al.*, 2001). As proteínas PR são classificadas em 17 famílias de acordo com a sua estrutura, sorologia e atividades biológicas (CHRISTENSEN *et al.*, 2002), dentro das quais encontram-se quitinases (PR-9), glucanases (PR-1, 2, 3, 4), endoproteíases, peroxidases (PR-11), inibidores de proteases (PR-6), além das pequenas proteínas como oxalato oxidases (PR-15), defensinas (PR-12), proteínas transportadoras de lipídeo (LTPs; PR-14) e tioninas (PR-13) (MUTHUKRISHNAN *et al.*, 2001; EDREVA, 2005; . ZHANG *et al.*, 1995). A família PR-10 é caracterizada por proteínas sem peptídeo sinal, ácidas, com baixo peso molecular, e com resistência a proteases (LIU E EKRAMODDOULLAH, 2006; WALTER *et al.*, 1990). A maioria das proteínas PR-10 é extracelular, mas algumas são encontradas no citoplasma, principalmente dentro do vacúolo (RADAUER *et al.*, 2008). Essa família pode ser dividida em dois grupos distintos de acordo com sua sequência de aminoácido, localização subcelular e sua função putativa: proteínas PR intracelulares (DPI), homologas a ribonucleases (VAN LOON *et al.*, 1994) e sintase S- norclaurine (SAMANANI *et al.*, 2004).

As proteínas PR tem sido descritas em resposta tanto ao estresse biótico quanto ao estresse abiótico como frio, seca, salinidade, metal pesado, entre outros. (ALTENBACH *et al.*, 2007). Geralmente estão envolvidas na atividade enzimática do metabolismo secundário em plantas em condições de estresse abiótico, bem como em atividade antimicrobiana e ribonuclease *in vitro* no caso de resposta a estresses bióticos (LIU E EKRAMODDOULLAH, 2006). Fitohormônios, como o ABA (relacionado a respostas a seca), e ácido jasmônico (JA), metiljasmônico e ácido salicílico(SA) (relacionados com a defesa contra estresses bióticos) foram relatados para regular a expressão de genes PR-10 (HWANG *et al.*, 2003, RAKWAL *et al.*, 1999). A expressão de genes PR-10 e PR-1 já foi demonstrada em condição de estresse abiótico. Moons *et al.* (1997) demonstraram que raízes de plantas de arroz submetidas a estresse salino (150 mM de NaCl) apresentavam uma superexpressão do gene PR-10. A expressão de

gene de PR-10 também aumentou em plântulas de pinheiro submetidas a estresse hídrico induzido por PEG (DUBOS e PLOMION, 2001). Além disso, as proteínas PR-10 tem sido relatadas como elementos de proteção ao frio, sendo acumuladas no espaço aploplástico de cereais, agindo como anti-congelantes (HON *et al.*, 1995). Em amoreira, foi observada a expressão de PR-10 em tecido cortical, quando as plantas foram submetidas ao frio indicando o envolvimento desse gene na tolerância ao frio em plantas lenhosas de clima temperado (UKAJI *et al.*, 2004). O efeito crioprotector das proteínas PR foi também evidenciado para uma PR-2 de tabaco (HINCHA *et al.*, 1997) e uma PR-5 em amendoim (DAVE e MITRA, 1998). As proteínas PR-10 possuem elevado número de resíduos polares (40%), comparável ao das dehidrinas (50%) (PNUELI *et al.*, 2002). Assim, é possível que as proteínas PR-10 possam funcionar como proteínas LEA, protegendo proteínas e outras estruturas celulares durante a dormência das sementes, resistência fria ou salinidade (PNUELI *et al.*, 2002; UKAJI *et al.*, 2004). Além dessas características, as proteínas PRs podem estar relacionadas ao armazenamento de nitrogênio, devido a seu nível elevado durante o inverno (ARORA *et al.*, 1994).

Recentemente, foi identificado nos laboratórios da UESC, um gene de PR-10 de cacau (*TcPR-10*) a partir de uma biblioteca de cDNA da interação suscetível *Theobroma cacao* L.- *Moniliophthora perniciosa* (GESTEIRA *et al.*, 2007). Através da análise da sequência da *TcPR-10*, foi mostrado que a proteína não possui peptídeo sinal sugerindo uma localização intracelular citosólica, característica contrastante a outras proteínas PR, que possuem localização extracelular (ZIADI *et al.*, 2001). Este gene possui um tamanho de 779 pb com uma matriz de leitura aberta (ORF) de 480 nucleotídeos que codifica uma proteína de 159 resíduos de aminoácidos, ponto isoelétrico de 5,57 e massa molecular de 18 KDa. Também já foi demonstrado, a *TcPR-10* também possui atividade antifúngica e RNase *in vitro* (PUNGARTNIK, *et al.*, 2009; MENEZES *et al.*, 2012).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Analisar a superexpressão de dois genes, *HVA22* e *TcPR-10*, em relação a tolerância ao estresse hídrico por transformação de plantas de tabaco.

3.2 Objetivos específicos

- Obter genes de citros relacionados com a tolerância a estresse hídrico;
- Engenheirar o gene *HVA22* de citros em vetores de transformação de plantas;
- Transformar plantas de tabaco com *HVA22* e *TcPR10* utilizando *Agrobacterium tumefaciens*;
- Caracterizar as plantas transformadas quanto à integração e expressão dos genes candidatos e respostas a condições simuladas de deficiência hídrica;
- Avaliar fisiologicamente a tolerância das plantas de tabaco transformadas, quando submetidas a estresse hídrico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e no Laboratório de Biologia Molecular localizados no Centro de Biotecnologia e Genética (CBG), bem como na casa de vegetação associada ao CBG. Os experimentos de fisiologia foram feitos com o auxílio do Prof. Dr. Alex-Alan Furtado de Almeida (UESC).

4.1. Identificação e amplificação dos genes de citros relacionados com estresse hídrico

Allario *et al.* (2012) encontraram genes diferentemente expressos por microarranjos e RT-qPCR entre citros 2x (pouco tolerante a estresse hídrico) e 4x (altamente tolerante). A partir desse trabalho foram escolhidos sete genes superexpressos em condições de estresse por seca. O gene putativo *HVA22*, que é induzido por estresses ambientais, tais como desidratação, salinidade e temperaturas extremas, e também pelo ABA; LEA (group I late embryogenesis abundant protein) que são sintetizadas em condição de déficit hídrico, favorecendo a estabilização de proteínas; AOX (alternative oxidase mitochondrial precursor) com atividade antioxidante; CCR (cinnamoyl-CoA reductase-like protein) catalisa o primeiro passo para a síntese de lignina; WAX2 (cuticle protein) limita a perda de água e a entrada de radiação na folha; CAO (chlorophyllide A oxygenase chloroplast precursor) envolvido na biossíntese de clorofila; e ERD4 (early-responsive to dehydration protein) responsável pela estabilização de proteínas em condição de déficit hídrico.

Com o número de acesso indicado por Allario *et al.* (2013), para cada um dos 7 genes candidatos, foi feita uma busca no *Citrus Genome Database*

(<http://www.citrusgenomedb.org/>), onde foi encontrada a sequência dos genes estudados. As sequências foram analisadas no que diz a respeito: i) da detecção da fase aberta de leitura (ORF) usando o ORFinder software; ii) da busca de sequências homólogas usando o BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1997); iii) da predição do ponto isoelétrico e peso molecular putativos da proteína (www.expasy.org); iv) da presença de domínio conservado usando Pfam programa (<http://pfam.sanger.ac.uk/search/sequence>); v) da predição de possíveis sítios de fosforilação (NetPhos 2.0 Server; BLOM *et al.*, 1999), de N-glicosilação (NetNGlyc 1.0 Server; <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) e de acetilação de tipo KAT (Wang *et al.*, 2012); vi) da detecção de peptide sinal e de domínios transmembranares (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) (KROGH *et al.*, 2001).

Utilizando-se o software Custom Primers-OligoPerfect™ Designer (Invitrogen) e o programa OligoAnalyser 3.1 (IDT SciTools/Integrated DNA Technologies, Inc. – Califórnia, EUA), foi feito o desenho dos oligonucleotídeos específicos para amplificar as sequência dos genes. Após a amplificação foi traçada a estratégia de clonagem para cada um dos genes (Tabela 1).

Tabela 1. Genes identificados por Allario *et al.* (2013) e utilizados para o presente estudo. São apresentados os primers desenhados e enzimas de restrições escolhidas para estratégia de clonagem.

Nome do gene	Nº de acesso	Enzimas de restrição	Primers
<i>AOX</i>	C31601G7	<i>ApaI</i> e <i>HindIII</i>	F: 5'-CCATGACCGCCATTGCTACTG-3'
			R: 5'-CGGAGACTGTTTCTGTTCTCTGCC-3'
<i>CAO</i>	KNOAAP7YK07	<i>ApaI</i> e <i>XhoII</i>	F: 5'-GAGCAGCGTTTTGACTGACCGAAG-3'
			R: 5'-CAATCTCAAATTCATCCATCTCAGTGG-3'
<i>CCR</i>	C34205C03	<i>PstI</i>	F: 5'-CGCAAGAATGGCTCATG-3'
			R: 5'-GCACACATAACAAAGACCCTACTC-3'
<i>WAX</i>	C02002B06	<i>ApaI</i> e <i>XhoII</i>	F: 5'-GGATGGATGCTCCTTTGGCAGC-3'
			R: 5'-CTTTATGACGAAATCTGACGATTCCTGAGGC-3'
<i>HVA22</i>	C31106H02	<i>Eco24I</i>	F: 5'-CGATTCATCACTTTATTTCATCAGTCAG-3'
			R: 5'-CTTCTTTTCTTGTAGTTGGTTAGTATGC-3'
<i>LEA</i>	C01019H06	<i>NcoI</i>	F: 5'-AACGTACCCAGATGGATTTTCG-3'
			R: 5'-GTACATCAAACAACAAATGATCCTG-3'
<i>ERD4</i>	C34209G11	<i>ApaI</i> e <i>XhoI</i>	F: 5'-GTGAAAATGCAGTCCATGAAG-3'
			R: 5'-AACCTCATTCTTACAAATTGACCA-3'

Para extração de RNA, foram utilizadas amostras de folhas de plantas previamente submetidas a estresse hídrico no campo experimental da Embrapa Mandioca e Fruticultura (Cruz das Almas, Bahia) das espécies *Citrus clementina*, *C. sinensis* e *C. limonia*. Para extração do RNA total, o kit RNAqueous foi utilizado

conforme as instruções do fabricante (Ambion, Inc.). A qualidade e integridade do RNA foram avaliadas por análise em gel de agarose 1,5%. O cDNA dupla fita foi sintetizado utilizando o *Super Script Double Stranded cDNA Synthesis kit*, seguindo as recomendações do fabricante (Invitrogen®).

O DNA total das variedades *Citrus limonia*, *C. clementina* e *C. sinensis* foi extraído pelo método CTAB (MURRAY & THOMPSON, 1980), afim de testar os *primers* e para otimizar o programa de amplificação PCR. Os programas utilizados foram: i) para HVA22, CCR, AOX e LEA, desnaturação inicial de 94 °C por 3 minutos, 40 ciclos de 94° por 30 segundos, anelamento de acordo com a Tabela 1 por 30 segundos, 72°C por 1 minuto; e uma extensão final de 72°C por 10 minutos; e ii) para os genes WAX2, CAO e ERD4, o programa utilizado seguiu os mesmos passos anteriores com alteração no tempo de extensão inicial que foi de 4 minutos, devido ao fato desses genes possuírem mais pares de bases.

4.2. Clonagem do cDNA HVA22 em vetor de transformação de plantas

O cDNA dos genes *AOX*, *CCR*, *LEA* e *HVA22* amplificado como descrito tópico 4.1. acima, foi clonado no vetor pGEM-T (Promega, EUA) por meio do sistema de clonagem TA. O produto de ligação foi utilizado para transformar *Escherichia coli*, estirpe TOP 10 através de choque térmico, onde o produto de ligação foi colocado em contato com as bactérias no gelo por 10 minutos para posterior choque térmico a 42 °C por 1 minuto, e em seguida colocadas para multiplicação em meio LB líquido sem adição de antibiótico por 1 hora. Após o processo de transformação, foi escolhido dar continuidade ao trabalho com o estudo do gene *HVA22*, sendo que os outros genes serão usados em trabalhos subsequentes. A inserção e a orientação da sequência no vetor foram confirmadas por digestão do DNA plasmidial com endonuclease específica (para *HVA22* foi utilizada a enzima *EcoR24I*) e por PCR usando os *primers* HVA-F e HVA-R (Tabela 1). As etapas seguintes para a clonagem do gene *HVA22* consistiram na retirada da sua sequência do plasmídeo pGEM-T por meio de digestão com as enzimas *ApaI* e *SpeI* e sub-clonagem no mesmo sítio de restrição do plasmídeo pUC118/CaMV35S. Os clones bacterianos contendo a sequência de cDNA em orientação senso foram identificados por meio de digestão com as enzimas de restrição *BamHI* e *EcoR24I*. O cassete foi posteriormente retirado do plasmídeo pUC118/CaMV35S e inserido no vetor de transformação de plantas pCAMBIA 2301, empregando-se a enzima *PstI*. O vetor

pCAMBIA 2301 contém o gene repórter *uidA* (GUS) e o gene seletivo *nptII* (*neomycin phosphotransferase II*), ambos sob o controle do promotor constitutivo CaMV35S (Figura 2). Para transformação genética de tabaco, o vetor pCAMBIA 2301, foi introduzido na cepa de *Agrobacterium tumefaciens* EHA-105 pela técnica de choque térmico. A cepa foi submetida a resfriamento utilizando nitrogênio líquido com posterior incubação à 37 °C por 15 minutos. Logo após foi incubada por 2 horas à 28 °C e ressuspendidos em meio YEP (extrato de levedura, peptona bacteriológica e NaCl).

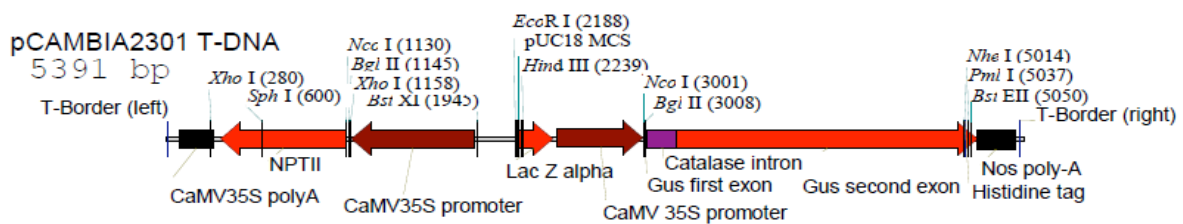


Figura 2. Esquema da região do T-DNA do vetor binário pCAMBIA2301 modificado, indicando os genes presentes no vetor e o sítio múltiplo de clonagem sob o controle do promotor CaMV35S.

4.3. Sequenciamento do cDNA *HVA22*

Para o sequenciamento do gene *HVA22*, foi utilizado o fragmento de cDNA clonado no plasmídeo pGEM-T. A metodologia seguiu o protocolo de sequenciamento no ABI3130XL utilizando sequenciador Applied Biosystems 3500/3500xL *Genetic Analyzer User Guide*. Para a reação foi utilizado 0,5 µl de DNA Big Dye, 1 µl de sequencing buffer 5X, 1 µl de cada *primer* específico para o plasmídeo pGEM-T (*primer* F: 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3' e *primer* R 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'), 0,5 µl do gene *HVA22* purificado e ligado no plasmídeo pGEM-T, 7 µl de H₂O ultra pura, em volume de reação de 10 µL. As reações foram amplificadas em termociclador TC-412 (Techne, Inglaterra), com uma desnaturação inicial de 96 °C por 3 minutos, 25 ciclos de 96 °C por 15 segundos, 50 °C por 10 segundos, 60 °C por 4 minutos; e uma extensão final de 4 °C por 1 minuto. Após a reação de amplificação foi realizada a purificação das amostras com 1 µL de EDTA 125 mM, 1 µL de acetato de sódio 3 M, 25 µL de etanol 100%, colocados em temperatura ambiente por 15 minutos, seguido de centrifugação a 1400 g por 15 minutos. Foram adicionados 35 µL de etanol 70%, e os tubos foram centrifugados a 4

°C, com rotação de 1650 g por 15 minutos, seguida de centrifugação com a placa invertida com rotação de 185 g por 1 minuto. Após essa etapa a placa foi colocada para secar e foi adicionado 10 µL de *Hi-Di* formamida e então colocada no sequenciador.

4.4. Análise filogenética de HVA22

A sequência proteica HVA22, juntamente com sequências homólogas de *Arabidopsis thaliana* descritas no trabalho de Chen *et al.* (2002), bem como de *C. clementina* e *C. sinensis* foram alinhadas para comparação e análise filogenética. O alinhamento das sequências de aminoácidos foi efetuado utilizando o programa ClustalW (<http://clustalw.genome.jp/>) (THOMPSON *et al.*, 1994) e a árvore filogenética foi gerada utilizando o método Neighbor-Joining (SAITOU; NEI, 1987), com a opção de bootstrap (1000 repetições). A árvore filogenética foi construída pelo programa MEGA4 (TAMURA *et al.*, 2007).

4.5. Transformação de plantas com HVA22 e TcPR10

Para este trabalho, além da construção contendo o gene *HVA22* de citros obtida como descrito acima, foi utilizada uma construção contendo o gene *TcPR10* de cacau resultante do trabalho de tese da discente Fabiana Calvacante (Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular- UESC).

4.5.1. Material vegetal

Plântulas de *Nicotiana tabacum* var. Havana, propagadas à partir da germinação *in vitro* de sementes, foram utilizadas como fonte de explantes. No presente trabalho a espécie *N. tabacum* foi utilizada por ser considerada uma planta modelo possibilitando varios estudos funcionais, devido as suas características favoráveis, tais como: genoma sequenciado(http://solgenomics.net/tools/blast/index.pl?db_id=196;<http://www.pngg.org/tgi/>), genoma de tamanho reduzido, facilidade da transformação genética, grande número de sementes por planta, alta taxa de regeneração *in vitro* e ciclo curto (BRASILEIRO; CARNEIRO, 1998; SENTHIL-KUMAR, *et al.*, 2007).

4.5.2. Cultura e manutenção dos isolados de *Agrobacterium tumefaciens*

A estirpe de *A. tumefaciens* EHA105 foi utilizada nos experimentos. As culturas foram conservadas a -80°C em solução de glicerol (50%) e meio de cultura YEP líquido (10 gL^{-1} de extrato de levedura, 5 gL^{-1} de NaCl e 5 gL^{-1} de peptona). A partir dessa solução, as bactérias foram plaqueadas em meio de cultura YEP sólido (suplementado com 100 mg L^{-1} de canamicina e 50 mg L^{-1} de rifampicina) e incubada a 28°C por 48h. Após esse período, colônias isoladas foram selecionadas e transferidas para meio de cultura YEP líquido contendo 100 mg L^{-1} de canamicina e 50 mg L^{-1} de rifampicina, e incubadas overnight a 28°C sob agitação (200 rpm). Em seguida, a solução foi centrifugada por 15 min a 5000 rpm e o pellet foi ressuspensionado em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) para subsequente uso em transformação genética de plantas.

4.5.3. Transformação genética de tabaco, regeneração e aclimatização

Plantas de tabaco foram transformadas via *A. tumefaciens*, conforme protocolo descrito por Brasileiro e Carneiro (1998), com o gene candidato de tolerância a seca *TcPR10* clonado no pCambia 3301 modificado. O gene *HVA22* clonado em pCambia 2301 também foi utilizado na transformação. Ambos os plasmídeos são dirigidos pelo promotor constitutivo CaMV35S. Os explantes foram obtidos a partir de folhas de *N. tabacum*, as quais foram cortadas em quadrados de aproximadamente 3 cm^2 e colocadas em contato com a suspensão bacteriana ($\text{OD}_{600} = 0,5$) por 15 minutos a temperatura ambiente sob leve agitação.

Os explantes foram posteriormente lavados com água destilada estéril, secos com papel de filtro e mantidos durante 48 horas no escuro (período de co-cultivo) em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) sólido, sem adição de antibióticos. Após esse período, os explantes foram transferidos para placas contendo meio seletivo de regeneração de brotos, com sais e vitaminas de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), 10 mgL^{-1} de finale e 300 mgL^{-1} de timentin, para o *TcPR10* e 10 mgL^{-1} de canamicina e 300 mgL^{-1} de timentin, para *HVA22*. Além de acetoseringona e BAP para ambos os genes.

Para a etapa de enraizamento, os brotos com aproximadamente 1 cm de tamanho foram excisados e transferidos para frascos tipo Magenta contendo meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) sólido acrescido de 300 mgL⁻¹ de timentin. Após o enraizamento dos brotos, obteve-se dez clones de cada planta transformada, representando 15 linhagens distintas, por meio de micropropagação. As plantas foram mantidas em sala de crescimento sob fotoperíodo em 16h/8h (luz/escuro) à temperatura de 25±2 °C. Foram selecionadas sete linhagens transformadas de tabaco confirmadas pelo PCR com os *primers* 35s F e PR10 R, com programa que consistiu em: desnaturação inicial de 94 °C por 3 minutos, 40 ciclos de 94°C por 1 minuto, anelamento 58 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto e 30 segundo; e uma extensão final de 72 °C por 10 minutos, sendo 5 para cada construção (35S::*TcPR10*) e uma planta controle não transformada (NT) e uma planta transformada com o vetor 3301 sem a inserção do gene. As plantas foram propagadas vegetativamente, aclimatizadas e transferidas para vasos de 20 litros com solo e areia em casa de vegetação (Figura 3).

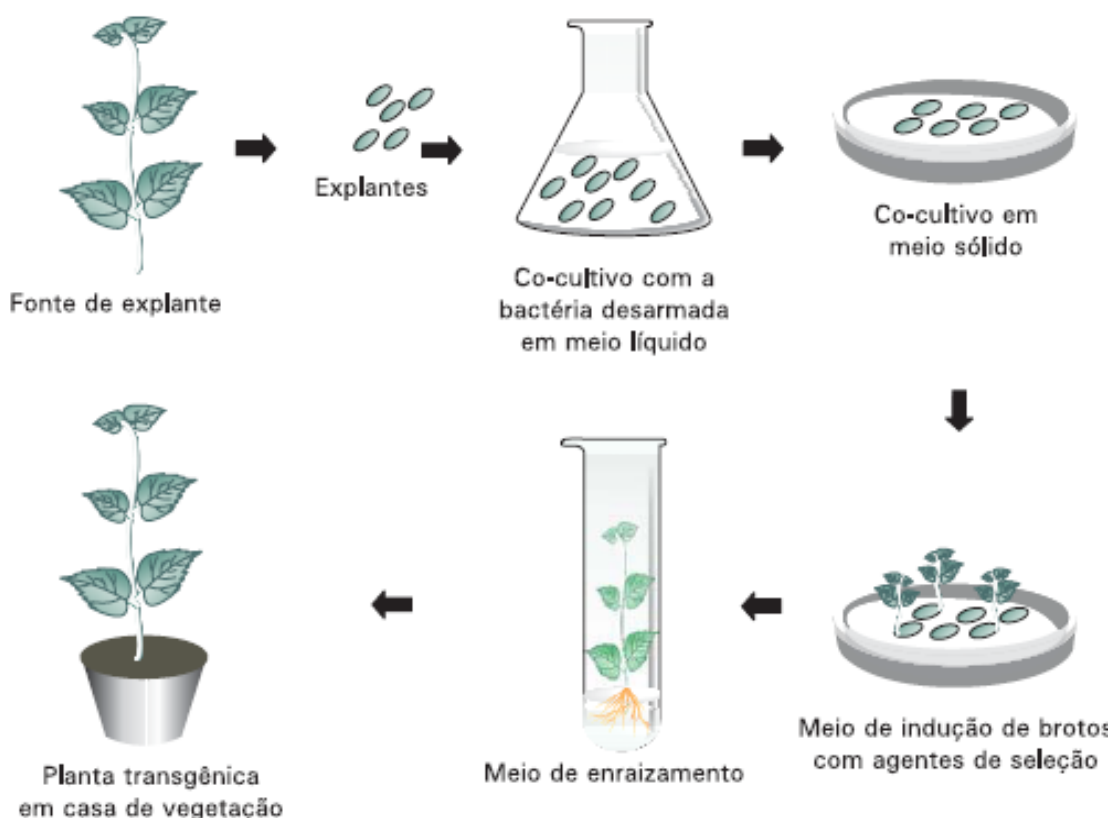


Figura 3. Esquema do procedimento de transformação de plantas com *Agrobacterium tumefaciens*. Fonte: Brasileiro e Carneiro (1998).

4.6. Caracterização das plantas transgênicas com a construção 35S::*TcPR10*

As plantas transformadas com *35S::TcPR10* foram utilizadas para testes fisiológicos devido ao seu estágio favorável de desenvolvimento. Já as plantas transformadas por *35S::HVA22*, por estarem na fase de broto não foram utilizadas, necessitando maior desenvolvimento antes de poder aplicar os testes fisiológicos.

4.6.1. Extração de DNA genômico e análise da inserção dos genes por PCR

Para a confirmação da inserção do transgene nas plantas de tabaco, extrações de DNA genômico das plantas foram realizadas de acordo com o método CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990), seguidas de PCR utilizando *primers* específicos para a sequência referente ao gene 35s.

A amplificação foi realizada empregando-se 0,5 µL de DNA (50-100 ng), 0,5 µL de dNTPs (10 mM), 1,0 µL de MgCl₂ (25 mM), 1,25 µL de tampão (10X), 1,0 µL (2,5 µM) dos oligonucleotídeos específicos (*primer* F-5' CTATTTCTTTGCCCTCGGACGAG-3' e *primer* R-5' ATGAAAAAGCCTGAACTCACCGC-3') e 0,1 µL de Taq DNA Polimerase (Fermentas) (5U/ µl), em volume de reação de 12 µL. As reações foram amplificadas em termociclador TC - 412 (Techne, Inglaterra), com uma desnaturação inicial de 94 °C por 2 minutos, 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 50 °C por 1 minuto, 72 °C por 2 minutos; e uma extensão final de 72 °C por 10 minutos. O PCR foi avaliado por eletroforese em gel de agarose (1%) corado com gel red (0,5 µg mL⁻¹) e fotografado em luz UV no fotodocumentador Kodak EDAS 290.

4.6.2. Análises fisiológicas

4.6.2.1. Análise da perda do conteúdo de água

A perda do conteúdo de água foi avaliada em plantas de tabaco não transformada (controle) e transgênicas (geração T0) pela diferença entre o peso fresco inicial e final dos tecidos foliares em cada período avaliado. Para esta finalidade, amostras uniformes de discos foliares foram extraídas da folha mais jovem, totalmente expandida, de plantas adultas, com auxílio de um perfurador de 1,0 cm de diâmetro, evitando-se a nervura central. Em seguida, os discos foliares foram submetidos à desidratação em temperatura ambiente por 270 min, sendo as medições de peso fresco realizadas a cada 30 min. Cada

tratamento foi constituído por três repetições com seis discos foliares por repetição. Os dados foram submetidos à análise de regressão e análise de variância. Na análise de regressão as médias foram comparadas pelo teste Student com probabilidade de 1% e 5%.

4.6.2.2. *Deteção de H₂O₂*

Para avaliar o estresse oxidativo em tecidos foliares submetidos à desidratação, todos os discos foliares de tabaco analisados no tópico 4.6.2.1 foram submetidos ao ensaio de coloração histoquímica com DAB-HCl (3,3' – diaminobenzidene), conforme metodologia proposta por THORDAL-CHRISTENSEN *et al.* (1997). As amostras foram submetidas à infiltração a vácuo com 1 mg mL⁻¹ de DAB-HCl, por 4 h. Após esse período, os discos foliares foram fervidos em etanol 96% por 4 h e posteriormente fotografados em lupa para deteção da coloração marrom.

4.6.2.3. *Aplicação do estresse hídrico*

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, sendo que por quinze dias as plantas (T0) de 7 linhagens diferentes (NT, 3301, L21, L25, L20, L12, L26) foram irrigadas, próximo a capacidade de campo (Figura 4). Após esse período, as plantas foram submetidas à deficiência hídrica pela diminuição gradativa da irrigação nas plantas estressadas, e as plantas controle foram irrigadas próximo a capacidade de campo sendo 3 repetições por linhagem. Durante esse período os vasos foram cobertos por papel alumínio para evitar a perda de água do solo por evaporação.



Figura 4. Plantas de tabaco transformadas e controles em casa de vegetação durante o período de avaliação do experimento.

4.6.2.4. Medição do potencial hídrico foliar

Para avaliar o potencial hídrico (ψ_w) foliar, selecionaram-se folhas maduras da parte mediana das plantas. As determinações foram feitas no período antemanhã (*predawn*), utilizando-se bomba de pressão do tipo Scholander (m670, MS Instrument Co., Albany, USA). As medições das trocas gasosas foram realizadas em dois regimes hídrico foliar, entre -0,3 a -0,5 MPa para as plantas controle e de -1 a -1,5 Mpa para as plantas estressadas.

4.6.2.5. Medição das trocas gasosas foliares

As medições foram realizadas entre 8 e 10 h da manhã em três plantas (repetições biológicas) e três leituras, para cada linhagem e para cada condição hídrica. As trocas gasosas foram medidas com um sistema portátil de medição de fotossíntese Li-6400 (Li-Cor, USA) sob luz saturante artificial de $1000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$, de modo a determinar a taxa fotossint\u00e9tica l\u00edquida (A) e taxa de transpira\u00e7\u00e3o (E). A efici\u00eancia instant\u00e2nea (A/E) e intr\u00ednseca (A/g_s) de uso da \u00e1gua foi calculada a partir dos valores obtidos de A , E e g_s obtidos.

4.7. Delineamento experimental e an\u00e1lise estat\u00edstica

O experimento em casa de vegetação foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado, com três repetições para cada linhagem. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) As médias foram comparadas pelo teste *t* em níveis de 5% e 1% de probabilidade, utilizando o programa BioEstat 5.0 (AYRES *et al.*, 2007).

5. RESULTADOS

5.1. Identificação e obtenção de genes de citros relacionados com tolerância a estresse hídrico

Os *primers* desenhados para os 7 genes escolhidos (Allario *et al.*; 2013) para estudos funcionais por transformação de plantas, amplificaram cDNA correspondentes de *C. clementina* (Tabela 1). A amplificação feita primeiramente em gDNA de *C. clementina* possibilitou o estabelecimento das temperaturas de anelamento entre 54 °C e 62 °C (Figura 5 e Tabela 2) exceto para o gene WAX, que não foi possível amplificar a partir do gDNA provavelmente devido ao seu grande tamanho (Tabela 2). Para os genes amplificados, as bandas observadas estão de acordo com o tamanho esperado dos genes (Figura 5 e Tabela 2).

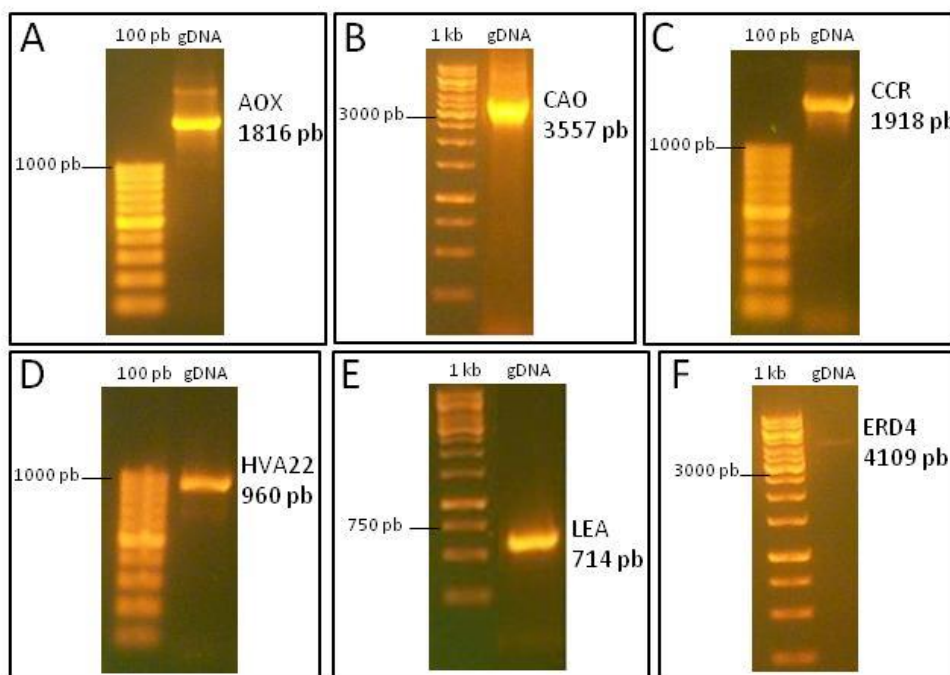


Figura 5. Amplificação de seis genes candidatos a partir do gDNA de *C. clementina* (teste dos primers). **A.** Gene *AOX*. **B.** Gene *CAO*. **C.** Gene *CCR*. **D.** Gene *HVA22*. **E.** Gene *LEA*. **F.** Gene *ERD4*.

Uma vez determinada a temperatura ótima para cada gene, esta foi utilizada para amplificação dos cDNA correspondentes oriundos de *C. clementina* cultivado sob condição de estresse hídrico. Foi possível amplificar cinco das sequencias escolhidas, sendo que não foi possível amplificar o cDNA ERD4 (Figura 6 e Tabela 2). Para os cDNA amplificados, as bandas observadas estão de acordo com o tamanho esperado (Figura 6 e Tabela 2).

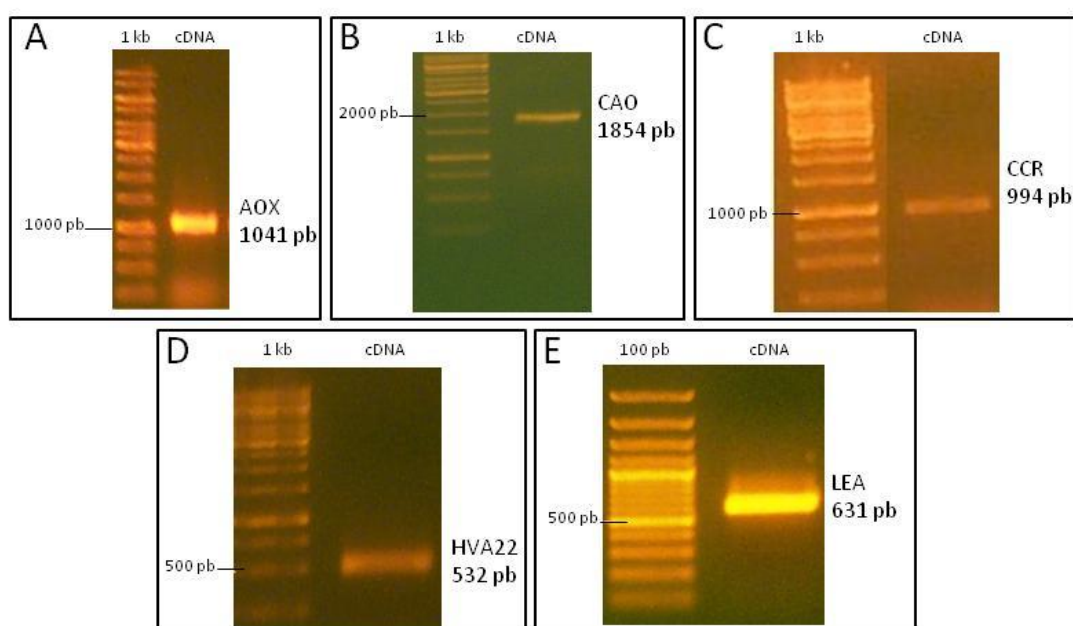


Figura 6. Amplificação de cinco genes candidatos a partir do cDNA de *C. clementina*. **A.** cDNA *AOX*. **B.** cDNA *CAO*. **C.** cDNA *CCR*. **D.** cDNA *HVA22*. **E.** cDNA *LEA*.

Tabela 2. Resumo da amplificação dos genes e cDNA de setes genes candidatos escolhidos a partir do estudo de Allario *et al.* (2013).

Nome do gene	Tamanho esperado do gDNA (pb)	Temperatura de anelamento otimizada em gDNA (°C)	Amplificação no gDNA	Tamanho esperado do cDNA (pb)	Amplificação no cDNA
AOX	1816	58	+	1041	+
CAO	3557	60	+	1854	+
CCR	1918	62	+	994	+
WAX	3713	nd	-	2629	-
HVA22	960	58	+	532	+
LEA	714	56	+	631	+
ERD4	4109	60	+	1903	-

5.2. Estudo do gene *HVA22* de *C. clementina*

5.2.1. Análise da sequência *HVA22*

O gene *HVA22* contém uma matriz de leitura aberta (ORF) de 435 pb, que codifica uma proteína de 144 aminoácidos (Figura 7), com massa molecular de 16,46 kDa e pI de 9,45. A proteína não contém sítios de glicosilação, contém seis sítios putativos de fosforilação (S₁₃, S₃₆, S₁₁₈, S₁₁₉, T₁₂₃ e Y₁₄₄) e dois sítios putativos de acetilação (K₁₀₈ e K₁₁₇) (Figura 7). Através da análise de domínio foi possível observar que a proteína *HVA22* não possui peptídeo sinal e possui um domínio TB2/DP1 (aminoácidos 12-96; Figura 7). A proteína *HVA22* também contém dois domínios transmembranares sugerindo uma localização transmembranar na célula (Figura 8).

```
1   atgagtcgtttctggaatttgatctatgggtgttcattcacttgcagggccagttctgatg   60
    M S R F W N L I Y G V H S L A G P V L M 20
61  ctgctgtatcccttatatgcatcagttgtggcaattgagagcccatcaaaagtggatgat   120
    L L Y P L Y A S V V A I E S P S K V D D 40
121 gagcagtggttctgcttattggattttgtattcatttctaactcttactgagatggtactc   180
    E Q W L A Y W I L Y S F L T L T E M V L 60
181 caaccggtttttagagtggataccaatttgggtactcgggtgaagctagtactagcggcatgg   240
    Q P V L E W I P I W Y S V K L V L A A W 80
241 ctggttctgccacagttcagaggtgctggccttttatatgaaagtttgtcagacagcaa   300
    L V L P Q F R G A A F I Y E R F V R Q Q 100
301 attaggcagtacagaggaggtaaagatcatcatcagcatcagcatcgcaagtcttctcct   360
    I R Q Y R G G K D H H Q H Q H R K S S P 120
361 actggcactggcaagggcaagaacaagtttggactttattatgccaagaagaagggag   420
    T G T G K G K N K F V D F I M P K K G E 140
421 cacgaggcataactaa 435
    H E A Y * 144
```

Figura 7. Sequência nucleotídica e protéica de *HVA22* de *C. clementina*. Os possíveis sítios de fosforilação e acetilação estão indicados em cinza e preto, respectivamente. * indica o códon de parada. O domínio TB2/DP1 esta sublinhado.

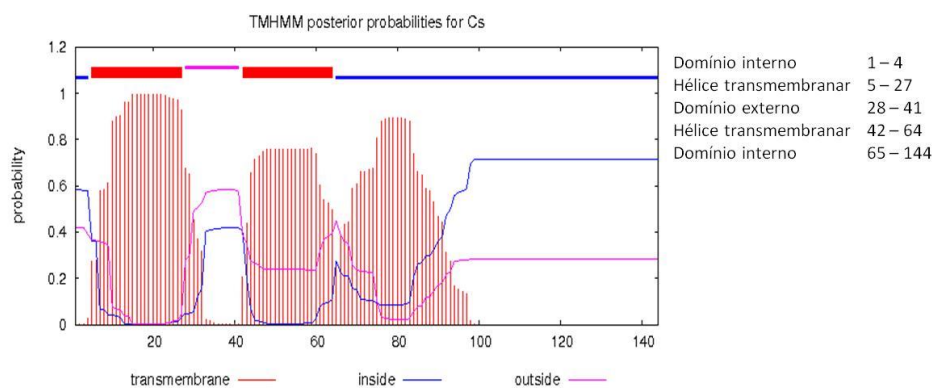


Figura 8. Predição de domínios transmembranar da proteína HVA22 de *C. clementina*. A posição (amino ácidos) dos domínios está indicada a direita da figura.

5.2.2. Análise filogenética

A sequência da proteína HVA22 de *C. clementina* identificada no presente estudo, junto com as sequências homólogas de *A. thaliana* descritas no trabalho de Chen *et al.* (2002) além da sequência do HVA22 de cevada – o primeiro a ser identificado pertencendo às proteínas do grupo LEA – foram alinhadas para comparação e análise filogenética (Figura 9). A análise filogenética indicou que a proteína HVA22 de *C. clementina*, está mais próxima das proteínas HVA22 de *A. thaliana* do que o HVA22 de cevada, que pertence a família LEA, confirmada pelo valor de *bootstrap*, sendo um homólogo do gene *AtHVA22d* e *AtHVA22e* de *A. thaliana*.

Figura 10. Confirmação da subclonagem de HVA22 em pUC118/CaMV35S por PCR. **1 a 5.** Amplificação de *HVA22* após clonagem em pUC118. **6.** Controle negativo. **M.** Marcador molecular 1 kb .

5.2.4. Sequenciamento do gene *HVA22*

Após clonagem em pGEM-T, o sequenciamento realizado certificou que o inserto clonado nesse vetor era a sequência que utilizada para o desenho dos *primers*. O resultado obtido pelo sequenciamento mostrou 99% de homologia entre as sequências (Figura 11).

5.2.5. Transformação de plantas de tabaco com o gene *HVA22*

Os experimentos de transformação genética de tabaco, a construção gênica *35S::HVA22* e o seu respectivo controle (plasmídeo 2301 sem o inserto), através do método de co-cultivo de explantes foliares (Figura 12A) possibilitou a regeneração dos brotos potencialmente transformados, após 20 dias após a incubação em sala de crescimento (Figura 12B).

CLUSTAL O(1.2.0) multiple sequence alignment

```

HVA_R2_C12/F2      CGATTTCATCACTTTATTCATCAGTCAGTTTTTCACAGTGTITATTTACTACAGTATCCAA
HVA                 CGATTTCATCACTTTATTCATCAGTCAGTTTTTCACAGTGTITATTTACTACAGTATCCAA
*****

HVA_R2_C12/F2      AAAAAAGAAAAATAAAAATGAGTCGTTTCIGGAATTGATCTATGGCGTTCATTCACCTT
HVA                 AAAAAAGAAAAATAAAAATGAGTCGTTTCIGGAATTGATCTATGGTGTTCATTCACCTT
*****

HVA_R2_C12/F2      GCAGGGCCAGTTCTGATGCTGCTGTATCCCTTATATGCATCAGTTGTGGCAATTGAGAGC
HVA                 GCAGGGCCAGTTCTGATGCTGCTGTATCCCTTATATGCATCAGTTGTGGCAATTGAGAGC
*****

HVA_R2_C12/F2      CCATCAAAAAGTGGATGATGAGCAGTGGCTTGCTTATTGGATTTTGTATTCATTTCTAACT
HVA                 CCATCAAAAAGTGGATGATGAGCAGTGGCTTGCTTATTGGATTTTGTATTCATTTCTAACT
*****

HVA_R2_C12/F2      CTTACTGAGATGGTACTCCAACCGGTTTTAGAGTGGATACC AATTTGGTACTCGGTGAAG
HVA                 CTTACTGAGATGGTACTCCAACCGGTTTTAGAGTGGATACC AATTTGGTACTCGGTGAAG
*****

HVA_R2_C12/F2      CTAGTACTAGCGGCATGGCTGGTICTGCCACAGTTCAGAGGTGCGGCTTTTATATATGAA
HVA                 CTAGTACTAGCGGCATGGCTGGTICTGCCACAGTTCAGAGGTGCGGCTTTTATATATGAA
*****

HVA_R2_C12/F2      AGGTTTGTGAGACAGCAAATAGGCAGTACAGAGGAGGTAAGATCATCATCAGCATCAG
HVA                 AGGTTTGTGAGACAGCAAATAGGCAGTACAGAGGAGGTAAGATCATCATCAGCATCAG
*****

HVA_R2_C12/F2      CATCGCAAGTCTTCTCCTACTGGCAGTGGCAAGGGCAAGAACAAAGTTTGTGGACTTTATT
HVA                 CATCGCAAGTCTTCTCCTACTGGCAGTGGCAAGGGCAAGAACAAAGTTTGTGGACTTTATT
*****

HVA_R2_C12/F2      ATGCCGAAGAAAGGGGAGCACGAGGCATACTAACCAACTACAAGAAAAGAAG
HVA                 ATGCCGAAGAAAGGGGAGCACGAGGCATACTAACCAACTACAAGAAAAGAAG
*****

```

Figura 11. Alinhamento das sequencias do cDNA *HVA22* oriundo do banco de dados e utilizado para desenho dos *primers* (n° de acesso C31106H02) e oriundo do sequenciamento após clonagem em pGEM-T.

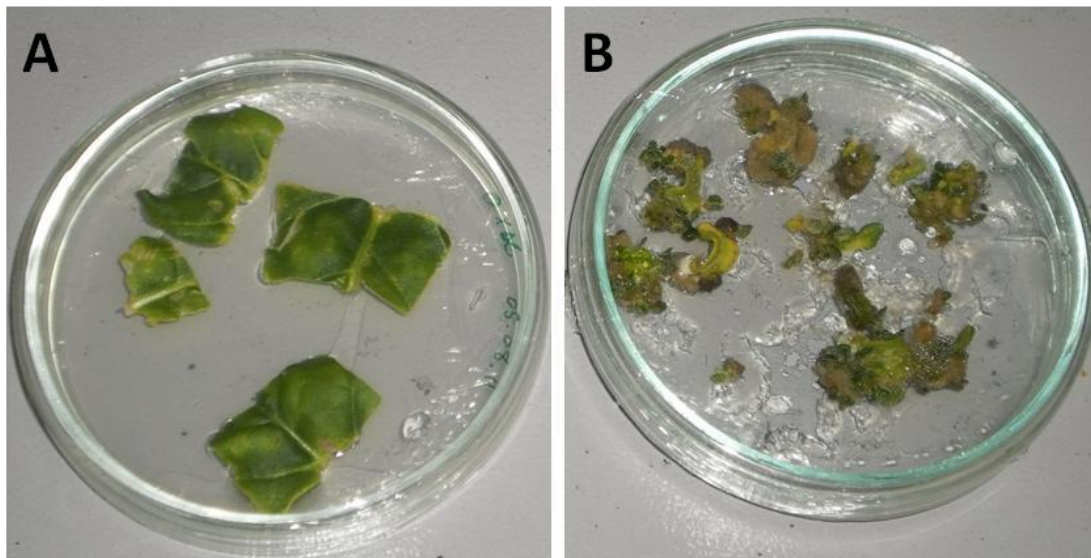


Figura 12. Transformação de plantas de tabaco com o gene *HVA22*. **A.** Explantes foliares transformados. **B.** Regeneração dos brotos após transformação.

5.3. Estudo do gene *TcPR-10*

5.3.1. Transformação genética de tabaco com o gene *TcPR-10*, regeneração e aclimação

Os explantes retirados das plantas de tabaco e transformados com a construção *35s::TcPR-10*, através de 3 repetições experimentais com 5 eventos de transformação cada, totalizaram 15 eventos. O mesmo ocorreu para as plantas transformadas com 3301 sem a inserção do gene (controle). Os transformantes foram mantidos em meio de co-cultivo suplementado com acetoserigona e finale durante dois dias (Figura 13A). Após esse período, foram transferidos para o meio contendo timentin e BAP. Com quinze dias os brotos foram individualizados (Figura 13 B) e colocados em meio para enraizamento (Figura 13 C), até que formaram a planta adulta (Figura 13 D).

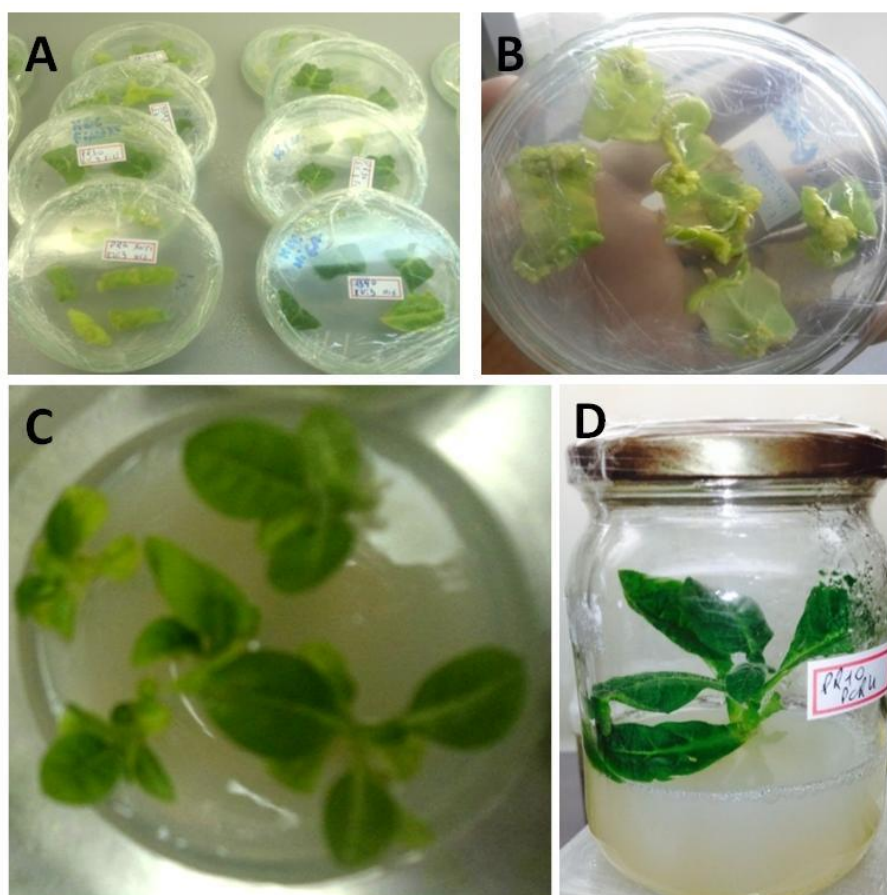


Figura 13. Etapas de transformação e regeneração de tabaco com o gene *TcPR-10*. **A.** Explantes foliares de tabaco transformados e mantidos em meio de co-cultivo. **B.** Início da brotação. **C.** Plântulas de tabaco em meio de enraizamento. **D.** Plântula de tabaco.

5.3.2. Confirmação da transformação das plantas de tabaco com a construção *35s::TcPR-10*

Através da extração do DNA genômico (Figura 14), as plantas T0 regeneradas oriundas de eventos de transformação aleatórios, foram confirmadas pela técnica de PCR com *primers forward e reverse* específicos do promotor 35S; o tamanho esperado da banda é de 500 pb (Figura 15). Todas as plantas testadas, exceto a planta 5, apresentaram uma banda de 500 pb correspondendo ao tamanho esperado da amplificação PCR do promotor 35S. Os controles negativos (planta não transformada e reação sem template) não apresentaram bandas (Figura 15).

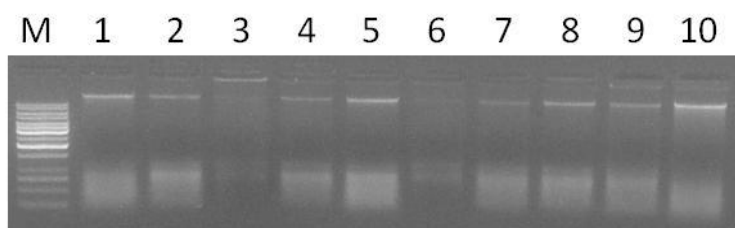


Figura 14. Extração de DNA de 10 plantas aleatórias transformadas com a construção *35s::TcPR10*.

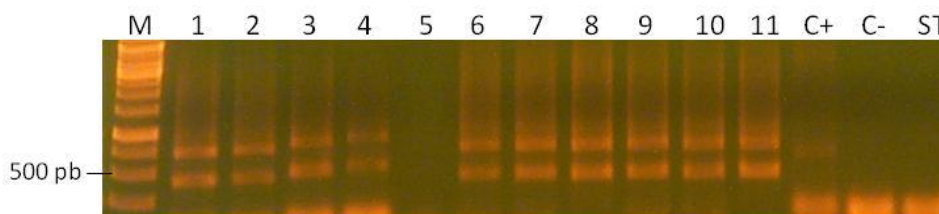


Figura 15. Confirmação da transformação por PCR utilizando primers específicos do promotor 35S. **1 a 11.** Plantas escolhidas aleatoriamente e sendo potencialmente transformadas com a construção *35s::TcPR-10*. C+: miniprep *35s::TcPR-10*. C-: planta não transformada (NT). ST: reação de PCR sem template.

5.3.3. Análise da tolerância a estresse por desidratação em linhagens transgênicas de tabaco

A superexpressão de *TcPR10* e sua correlação com a tolerância ao estresse por desidratação, foi observada através de um estresse de desidratação por curto prazo, onde discos foliares das plantas de tabaco foram desidratados em temperatura ambiente por 270 min. De um modo geral, observou-se que as linhagens transgênicas perderam

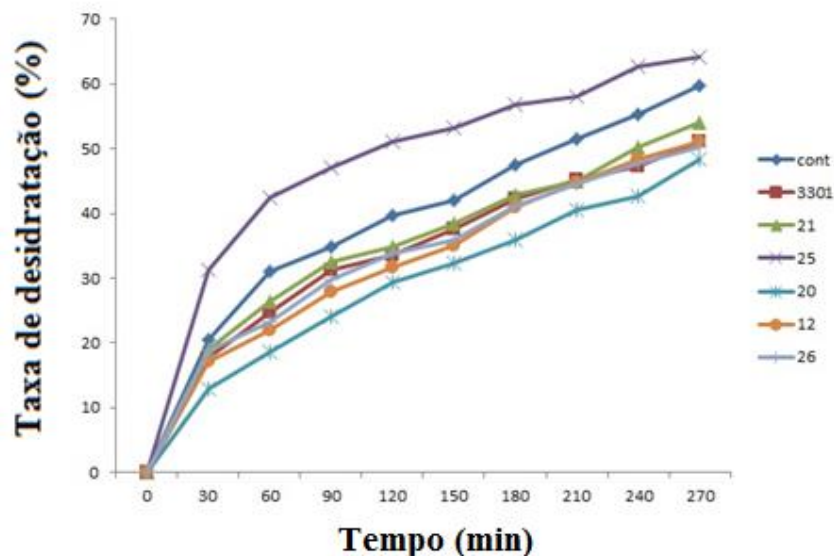
significativamente menos água em comparação à planta controle (Figura 16). A linhagem 25 apresentou taxa de desidratação significativamente maior ($64,24 \pm 3,53$) do que as plantas controle NT ($59,71 \pm 2,4$) já a partir de 30 min. A linhagem 21 e 3301 apresentaram taxa de desidratação iguais a planta controle ($54,03 \pm 1,45$ e $51,08 \pm 3,84$ respectivamente). As linhagens 20, 12 e 26 apresentaram menores taxas de desidratação ($48,03 \pm 3,61$; $51,11 \pm 1,86$ e $50,29 \pm 2,6$ respectivamente). Pôde-se observar uma redução significativa da perda de água nas plantas transgênicas em relação à planta controle a partir de 30 min. L20 foi a linhagem que apresentou a menor taxa de desidratação, seguida por L26 e L12 (Tabela 3). Ao final dos 270 min, as linhagens transgênicas apresentaram taxas de desidratação significativamente inferiores comparadas com a planta controle, exceto a L25 (Tabela 3 e Figura 16).

Tabela 3. Diferença média na taxa de desidratação das linhagens transgênicas e das plantas controle, entre os tempos de 0 a 270 minutos. As médias \pm erro padrão seguidas por * apresentam diferenças significativas com o controle pelo teste de Student ($P \leq 0,05$). CV: coeficiente de variação.

Linhagens	Taxa de desidratação (%)	CV(%)
Controle NT	$59,71 \pm 2,4$	17,33
Controle 3301	$51,08 \pm 3,84$	44,33
L21	$54,03 \pm 1,45$	6,33
L25	$64,24 \pm 3,53^*$	37,33
L20	$48,3 \pm 3,61^*$	39
L12	$51,11 \pm 1,86^*$	10,33
L26	$50,29 \pm 2,6^*$	20,33

5.3.4. Acúmulo de H₂O₂

Para investigar se a maior tolerância à desidratação das plantas transgênicas está correlacionada com menores níveis de estresse oxidativo, a produção de H₂O₂ foi analisada em discos foliares de tabaco após 270 min de desidratação, por meio da técnica de DAB-HCl (Figura 17). Na planta controle não-transformada, a desidratação causou um visível escurecimento ocasionado pelo acúmulo de H₂O₂ (Figura 17A). A intensidade de coloração dos discos foliares das plantas transgênicas foi menor e visivelmente distinta daquelas das plantas controle desidratadas (Figura 17C-G), indicando que as plantas transgênicas acumularam menos ROS sob condições de estresse por desidratação.



Linhagens	0	30	60	90	120	150	180	210	240	270
NT										
3301	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
21	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
25	ns	*	*	**	**	**	*	*	*	*
20	ns	**	**	**	**	**	**	**	**	*
12	ns	ns	**	*	*	*	*	ns	*	*
26	ns	ns	**	*	*	*	ns	ns	*	*

Figura 16. Taxa de desidratação de discos foliares da planta controle não-transformada, transformada com plasmídeo 3301 e linhagens transgênicas (L21, L25 L12 e L26) sob estresse durante 270 min em temperatura ambiente. Medição por redução de peso fresco a cada 30 min. * ($P < 0,05$) e ** ($P < 0,01$) indicam que a taxa de perda de água nas linhagens transgênicas é significativamente menor do que o controle no mesmo ponto de tempo pelo teste de Student.

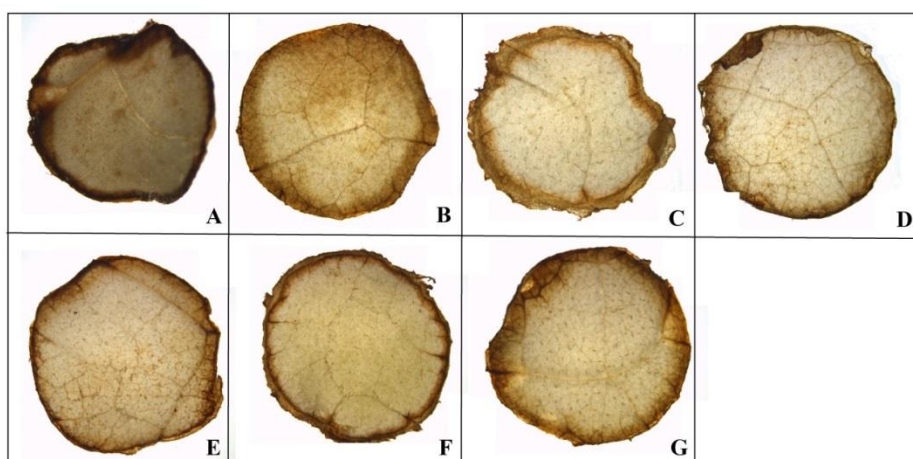


Figura 17. Produção de peróxido de hidrogênio em tecido foliar de *N. tabacum* inoculado com DAB-HCl (1 mg.mL^{-1}). Discos foliares foram submetidos ao estresse por desidratação durante 270 min e a produção de H_2O_2 foi visualizada através da coloração com DAB-HCL. **A.** Planta não-transformada submetida à desidratação. **B.** Planta transformada 3301. **C-G.** Linhagens transgênicas L21, L25, L20, L12 e L26, respectivamente, submetidas à desidratação.

5.3.5. Trocas gasosas

Os resultados evidenciaram diferença significativa na condutância estomática (gs) entre as linhagens transformadas (L25, L21, L20 E L12) quando comparadas com a linhagem NT ($0,020 \pm 0,11$ -controle e $0,13 \pm 0,63$ -estressada), já a linhagem 3301 ($0,04 \pm 0,47$ -controle e $0,11 \pm 0,21$ -estressada) não mostrou diferença significativa (Figura 18). Foi observada uma maior condutância estomática entre todas as linhagens transformadas, exceto 3301, tanto na condição controle quanto na condição estressada em relação ao NT. Podendo ser observado que L20 ($0,70 \pm 0,53$ -controle e $0,58 \pm 0,41$ -estressada) e L26 ($0,55 \pm 0,18$ -controle e $0,61 \pm 0,23$ -estressada) foram as que obtiveram maiores índices de condutância estomática, seguido por L12 ($0,42 \pm 2,78$ -controle e $0,54 \pm 0,29$ -estressada) e L25 ($0,21 \pm 0,32$ -controle e $0,21 \pm 0,43$ -estressada), enquanto L21 ($0,20 \pm 0,43$ - controle e $0,28 \pm 0,17$ -estressada) teve os menores índices (Figure 18).

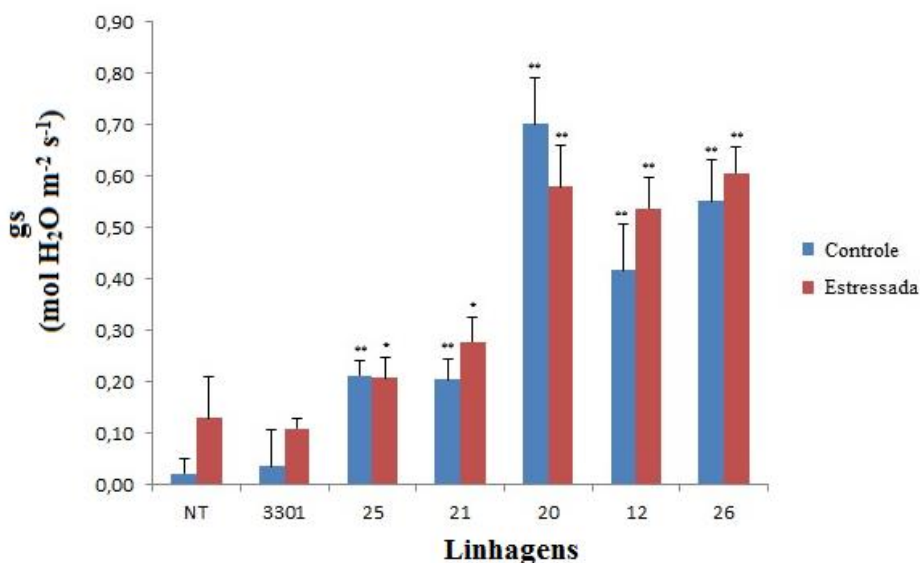


Figura 18. Condutância estomática (gs) medidas após o período de aplicação do estresse. Linhagens: NT, 3301, 25, 21, 20, 12 e 26 *TcPR-10*. * Diferença significativa pelo teste t ($p < 0,05$). ** Diferença significativa pelo teste t ($p < 0,01$).

Foi possível observar também que as linhagens contendo o gene *TcPR-10* obtiveram maiores taxas fotossintéticas (A) quando comparadas com a linhagem NT ($3,32 \pm 0,69$ -controle e $2,58 \pm 0,17$ -estressada) enquanto para a linhagem 3301 não houve diferença significativa ($2,93 \pm 0,15$ -controle e $2,60 \pm 0,50$ -estressada) (Figura 19). Foi observada uma maior taxa fotossintética entre todas as linhagens

transformadas, exceto 3301, tanto na condição controle quanto na condição estressada em relação ao NT. Podendo ser observado que L20 ($10,47 \pm 0,58$ -controle e $9,26 \pm 0,73$ -estressada), L26 ($7,26 \pm 0,29$ -controle e $10,85 \pm 0,33$ -estressada), L12 ($9,28 \pm 1,22$ -controle e $8,71 \pm 0,29$ -estressada) e L25 ($7,91 \pm 0,33$ -controle e $7,63 \pm 0,17$ -estressada) foram as que obtiveram maiores índices de taxa fotossintética e L21 ($7,21 \pm 0,44$ -controle e $7,63 \pm 0,17$ -estressada) a menor.

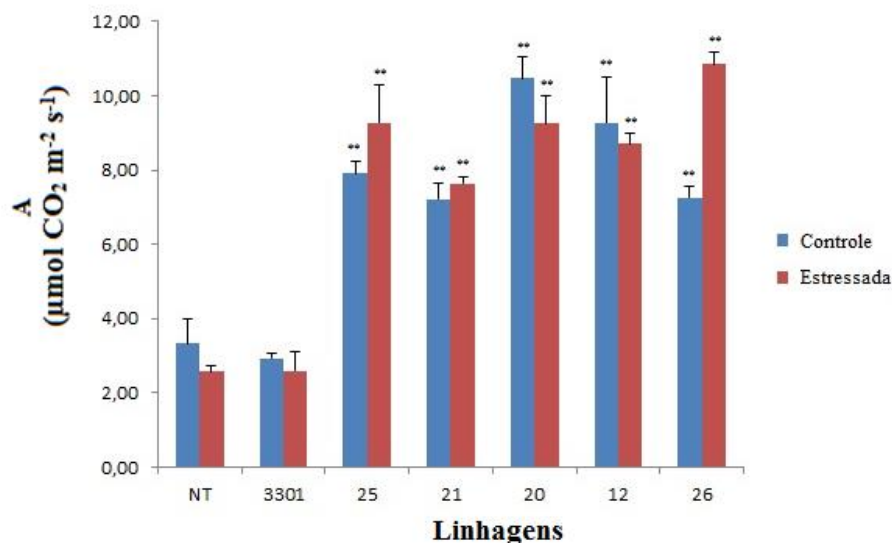


Figura 19. Taxa fotossintética (A) medida após o período de aplicação do estresse. Linhagens: NT, 3301, 25, 21, 20, 12 e 26 *TcPR-10*. * Diferença significativa pelo teste *t* ($p < 0,05$). ** Diferença significativa pelo teste *t* ($p < 0,01$).

Quando observada a taxa de transpiração entre as linhagens transformadas e NT, foi possível observar que a L20 ($5,21 \pm 0,17$ -controle e $4,79 \pm 0,33$ -estressada) e L26 ($4,73 \pm 0,17$ -controle e $4,76 \pm 0,33$ -estressada) seguiram o padrão anterior, com valores mais altos, seguida pela L12 ($3,49 \pm 0,76$ -controle e $4,67 \pm 0,33$ -estressada) comparadas a NT ($0,43 \pm 0,12$ -controle e $1,66 \pm 0,50$ -estressada). A L21 ($2,76 \pm 0,17$ -controle e $3,26 \pm 0,29$ -estressada) e L25 ($2,64 \pm 0,39$ -controle e $1,91 \pm 0,67$ -estressada) foram as que obtiveram menores índices, sendo que na L25 só foi observada diferença significativa na condição controle quando comparada a NT. Foi possível observar também que na condição estressada L3301 ($0,69 \pm 0,09$ -controle e $0,043 \pm 0,50$ -estressada) apresentou taxa de transpiração inferior ao NT (Figura 20).

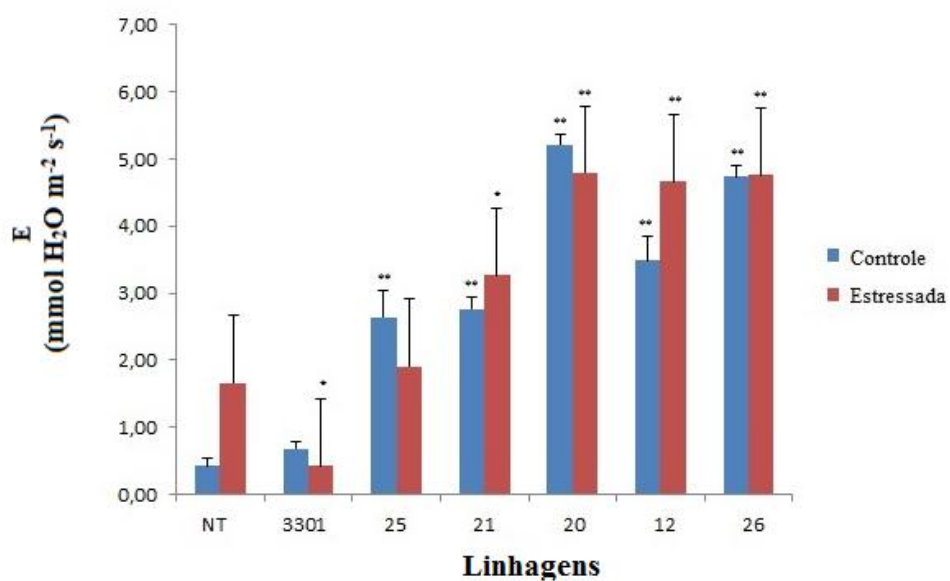


Figura 20. Taxa de transpiração (E) medidas após o período de aplicação do estresse. Linhagens: NT, 3301 25, 21, 20, 12 e 26 *TcPR-10*. * Diferença significativa pelo teste *t* ($p < 0,05$). ** Diferença significativa pelo teste *t* ($p < 0,01$).

6. DISCUSSÃO

6.1. Gene HVA22

A análise bioinformática do gene *HVA22* de citros mostrou que esse codifica para uma proteína básica, com pI de 9,45 e com domínios transmembranares (Figuras 7 e 8). Características semelhantes foram observadas por Shen *et al.* (2001) em um trabalho realizado com cevada onde a proteína HVA22 de cevada era básica com o pI de 9,2. Este gene *HVA22* possivelmente é de cópia única no genoma de citros e possui homologia com *HVA22* de outros organismos, além de possuir um domínio TB2/DP1 conservado, que foi observado em cevada (SHEN *et al.*, 2001) e *A. thaliana* (CHEN *et al.*, 2002). A presença do domínio TB2/DP1 pode estar relacionado ao tráfego vesicular, que é responsável pelo fornecimento de componentes para a parede celular, em particular nos tecidos ou regiões de planta em expansão como no caso das raízes (exemplo de expansão celular polarizada). Nos pelos radiculares – que servem para aumentar a área superficial das raízes – esse processo possibilita uma maior absorção da água e minerais (GILROY E JONES, 2000). Em levedura e plantas, a composição lipídica da membrana plasmática, é alterada em resposta as condições ambientais, e quem faz a entrega dos lipídios recém sintetizados à membrana são as vesículas de transporte. O transporte vesicular vai ser modelado de acordo com o ambiente, fornecendo assim uma mudança na composição lipídica da membrana (HAMROUNI *et al.*, 2001; HOLTHUIS *et al.*, 2001).

Estudos com homólogos de *HVA22* em *S. cerevisiae* (Yop1p) e *Xenopus* (DP1) demonstraram que a levedura é capaz de interagir fisicamente com várias Rab GTPases (YPT1, Ypt6, Ypt7 e YIF1) e com YIP1, que estão envolvidos no transporte de proteínas do RE para o complexo de Golgi, além de interagir com proteínas *Reticulon* (Rtn4/NogoA) para moldar o RE (YANG *et al.*, 1998; CALERO *et al.*, 2001; DE ANTONI *et al.*, 2002; VOELTZ *et al.*, 2006; HU *et al.*, 2008). Apesar de saber que o

RE de planta é responsável por diversos processos biológicos, entre eles a síntese e exportação de enzimas, precisa-se ainda esclarecer quais fatores estão envolvidos na sua biossíntese e formação (SPARKES *et al.*, 2009). Já é conhecido que os *Reticulons*, são proteínas integradas a membrana, são importantes para induzir a curvatura da membrana do RE em plantas e gerar túbulos, processo que também ocorre em mamíferos e levedura (TOLLEY *et al.*, 2008; SPARKES *et al.*, 2010; VOELTZ *et al.*, 2006; HU *et al.*, 2008).

O alinhamento das proteínas Yop1p, HVA22 de cevada e AtHVA22 indicou estruturas semelhantes, em particular um *loop* hidrofílico curto ladeado por dois trechos hidrofóbicos (MARCAS E HO, 2002). Quando alinhadas, às sequências de aminoácidos do HVA22 de citros com AtHVA22 e AtLEA, foi observado que o HVA22 de citros possuem maior homologia com AtHVA22d e AtHVA22e (Figura 9). Diferente do HVA 1 de cevada, primeiro HVA identificado, que faz parte do grupo da família LEA, e que a sua expressão está intimamente correlacionada com o desenvolvimento de tolerância à dessecação em embriões (BARTELS *et al.*, 1988). Portanto, sugere-se que o gene *HVA22* de citros não é membro da família LEA e poderia estar envolvido com o transporte vesicular.

A análise das plantas transgênicas já obtidas permitirá definir melhor o papel do gene *HVA22* de citros em relação ao déficit hídrico.

6.1. Gene *TcPR-10*

O gene *TcPR-10* foi identificado em biblioteca de cDNA da interação suscetível *Theobroma cacao* L.-*Moniliophthora perniciosa* (GESTEIRA *et al.*, 2007), mas o papel das PR-10 na tolerância a estresses abióticos como seca (DUBOS; PLOMION, 2001), salinidade (EKRAMODDOULLAH *et al.*, 1995), frio (WISNIEWSKI *et al.*, 2004), estresse oxidativo (PNUELI *et al.*, 2002) e irradiação (PINTO; RICARDO, 1995) tem sido relatado em outras plantas. Neste estudo, o gene *TcPR-10* foi utilizado para transformação de plantas de tabaco com o intuito de verificar o seu potencial como elemento de tolerância a déficit hídrico. Foram obtidas cinco linhagens de plantas transgênicas contendo o cDNA *TcPR-10* sob o controle do promotor CaMV35S (Figura 13).

O experimento de tolerância à desidratação possibilitou observar que quatro das cinco linhagens transgênicas avaliadas (L25, L20, L12 e L26) conservaram mais água

nas células em comparação às plantas não transformadas e transformadas com o plasmídeo 3301 (Tabela 3 e Figura 16). Entretanto, a linhagem 21 não mostrou diferença estatística em relação as plantas controle (Tabela 3 e Figura 16).

O acúmulo de peróxido de hidrogênio foi também avaliado nas linhagens transgênicas sob condições de desidratação. O peróxido de hidrogênio é a primeira resposta das plantas frente a estresses abióticos. Para evitar a morte celular por estresse oxidativo, as plantas devem manter baixos níveis de ROS minimizando assim os danos (HARB *et al.*, 2010; FOYER; SHIGEOKA, 2011). O acúmulo de ROS depende principalmente de um balanço entre a sua produção e simultânea atuação de antioxidantes não-enzimáticos (ácido ascórbico, GSH e prolina) e enzimas extintoras de espécies reativas de oxigênio (SOD, POD, PPO e CAT) (BUCHANAN; BALMER, 2005). Para a detecção do peróxido de hidrogênio, o DAB-HCL tem sido comumente utilizado, possibilitando a visualização diferenciada da coloração do material na presença deste composto (KIM *et al.*, 2008; SCANDALIOS, 2005). Neste estudo foi observado que as plantas transformadas com o gene *TcPR-10* apresentaram uma coloração mais clara que a planta não transformada, indicativo que as plantas transgênicas acumularam menos H₂O₂ em comparação as plantas controle NT (Figura 17). Portanto, pode concluir-se que as plantas superexpressando o gene *TcPR-10* (em particular as linhagens L25, L20, L12 e L26) apresentaram uma maior retenção de água e foram menos estressadas que as plantas controle.

As plantas transformadas com o gene *Tc-PR10* também foram submetidas a um ensaio de déficit hídrico, onde plantas controles (com potencial hídrico foliar entre -0,3 a -0,5 MPa), e plantas moderadamente estressadas (com potencial hídrico foliar entre -1 a -1,5 MPa) foram avaliadas quanto a condutância estomática, taxa fotossintética e transpiração (Figuras 18, 19 e 20). Em período de deficiência hídrica, o fechamento estomático é um dos primeiros mecanismos de defesa, diminuindo, conseqüentemente, a taxa de transpiração e reduzindo assim a desidratação. Pode ocorrer também uma diminuição da taxa fotossintética das plantas (TAIZ; ZEIGER, 2004; MAHAJAN; TUTEJA, 2005). Neste trabalho as análises fisiológicas demonstraram que as plantas transformadas com *TcPR-10* não seguiram esses parâmetros, sendo observadas maiores taxas de condutância estomática, transpiração e fotossíntese nas linhagens transgênicas submetidas às mesmas condições de estresse que a linhagem NT (Figuras 18, 19 e 20), indicando que as plantas controle (NT e 3301) apresentaram um nível de estresse – e uma resposta a ele na forma, entre outros, de fechamento estomático – maior que as

plantas superexpressando o gene da *TcPR-10*. Na condição de seca, o fechamento estomático pode ser ocasionado por duas razões principais: i) sinais hidrofílicos como potencial de água da folha e turgor celular alterados, e ii) sinais químicos como o fitormônio ABA. O ABA sintetizado nas raízes pode também ser transportado para a célula guarda pelo canal transpiratório, induzindo o fechamento estomático sob condições de seca (MULLER; WHITSHITT, 1996). Os dados obtidos nesta dissertação sugerem que o mecanismo de tolerância ao estresse hídrico devido a *TcPR-10* não se trata de um simples mecanismo de fechamento estomático, mas de uma resposta celular mais complexa. Uma explicação para a maior condutância estomática observada nas plantas transgênicas, pode estar relacionada à manutenção do turgor celular, permitindo a difusão de CO₂ para dentro do mesofilo das folhas, levando dessa maneira a uma maior taxa fotossintética (TEZARA *et al.*, 2003). Na maioria dos estudos que abordam as respostas moleculares à seca, o estado hídrico da planta, condutância foliar e taxa fotossintética, geralmente não são avaliados, o que torna difícil a comparação dos dados (PINHEIRO; CHAVES, 2011). Mas, testes *in vitro* tem evidenciado o potencial de PRs em conferir tolerância ao déficit hídrico. Jain *et al.* (2012), estudando a superexpressão da PR-10 de amendoim em plantas de tabaco cultivadas, sob condições de estresse salino, hídrico e metal pesado, apresentaram maior tolerância a estas condições de estresse do que os controles. No nosso trabalho também foi observado que a taxa fotossintética não foi reduzida diante da situação de estresse (Figura 19).

Diante destes resultados, algumas hipóteses sobre o papel da *TcPR-10* nas linhagens transgênicas podem ser consideradas. A *TcPR-10*, como outras PR-10 já descritas, possui um elevado número de resíduos polares (50,97%; dado não mostrado/PUNGARTNIK *et al.*, 2009), comparável ao das dehidrinas, membro da família LEA (50%) (PNUELI *et al.*, 2002). Portanto, é possível que a proteína *TcPR-10* possa funcionar como uma proteína LEA protegendo proteínas e outras estruturas celulares durante a dormência, tolerância ao frio ou salinidade. Contudo, a proteína *TcPR-10* também possui, como outras PR-10, uma ampla cavidade hidrofóbica (MENEZES *et al.*, 2012). Em estudos estruturais de PR-10 foi mostrado que estas proteínas tem alta similaridade com proteínas de ligação a citocininas (*cytokinin-specific binding protein*, CSBP) e com domínios START (steroidogenic acute regulatory protein (StAR)-related lipid transfer, START) (FERNANDES *et al.*, 2008; FERNANDES *et al.*, 2009). Assim, os resultados observados no nosso estudo poderiam ser relacionados à afinidade de ligação da *TcPR-10* com citocininas (FERNANDES *et al.* 2008), que

forneem bioativos adequados para permitir uma resposta fotossintética adequada em condição de estresse (JAIN *et al.*, 2012). Mas também, considerando que o domínio START é um elemento importante das proteínas da família dos receptores ao ABA (START family of abscisic acid ABA receptors; JOSHI-SAHA *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2013), não pode ser descartado que a proteína TcPR-10 possa se ligar a o ABA, desviando este fitohormônio da sua interação com os receptores posicionados no início da cascata de sinalização que promove o fechamento dos estômatos (MULLER; WHITSHITT, 1996). Finalmente, a proteína TcPR-10 tem função de ribonuclease (PUNGARTNIK *et al.*, 2009; MENEZES *et al.*, 2012) e poderia participar no *turn-over* de ácidos nucleicos em resposta a estresses abióticos como forma de remobilização de nucleotídeos ou fosfato para órgãos da planta em formação (MURAMOTO *et al.*, 1999; DUBOS; PLOMION, 2001). De forma geral, os dados apresentados aqui são bons indicativos da participação da *TcPR-10* no mecanismo de resposta à seca, o que faz deste gene um bom candidato para futura transformação de porta-enxerto de citros.

7. CONCLUSÕES

- O gene *HVA22* de citros é um ortólogo de *AtHVA22d* e *AtHVA22e* de *Arabidopsis*;
- As plantas transgênicas foram mais tolerantes ao estresse por desidratação, sendo evidenciado um baixo acúmulo de espécies reativas de oxigênio, o que sugere uma atuação da *TcPR-10* na detoxicação;
- As plantas transformadas com *TcPR-10* apresentaram maior condutância estomática, fotossíntese e transpiração, quando comparadas a planta não transformada, sendo mais tolerante ao estresse por déficit hídrico.
- O gene *TcPR-10* pode ser empregado em trabalhos de transformação genética de variedades porta-enxerto de citros, visando a obtenção de plantas mais tolerantes à seca.

8. REFERÊNCIAS

- ALLARIO, T.; BRUMOS, J.; COLMENERO-FLORES, J. M.; IGLESIAS, D. J.; PINA, J. A.; NAVARRO, L.; TALON, M.; OLLITRAULT, P.; MORILLON, RAPHAEL. Tetraploidy in the rootstock confers increased drought tolerance via the constitutive overexpression of drought-responsive genes and abscisic acid production in grafted citrus. **Plant, Cell and Environment**. p. 1-11, 2013.
- ALMEIDA, C.O.; PASSOS, O.S. Citricultura brasileira em busca de novos rumos. Desafios e oportunidades na região Nordeste. Cruz das Almas: **Embrapa Mandioca e Fruticultura**. p. 13-31, 2011.
- ALMEIDA, W. A. B.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; PINO, L. E.; BOSCARIOL, R. L.; RODRIGUEZ, A. P. M.; MENDES, B. M. J. Genetic transformation and plant recovery from mature tissues of *Citrus sinensis* L. Osbeck. **Plant Science**, Limerik, v. 164, n. 2, p. 203-211, 2003.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res**, **25**, p.3389-3402, 1997.
- ARORA, R.; WISNIEWSKI, M.E. Cold acclimation in genetically related (sibling) deciduous and evergreen peach (*Prunus persica* [L.] Batsch): II. A 60-kilodalton bark protein in cold acclimated tissues of peach is heat stable and related to the dehydrin family of proteins. **Plant Physiology** **105**, p. 95–101, 1994.
- BARTELS, D.; SUNKARS, R. Drought and salt tolerance in plants. **Critical Reviews in Plant Science** **24**, p. 23–58, 2005.
- BELASQUE, JR. J.; BARBOSA, J.C.; MASSARI, C. A.; AYRES, A. J. Incidence and distribution of Huanglongbing in São Paulo, Brazil. **Citrus Research & Technology** **31**, p.1-9, 2010.
- BLATT, M.R. Ca²⁺ signaling and control of guard-cell volume in stomatal movements. **Current Opinion Plant Biology**. Vol.3, pp. 196–204. 2000.
- BLOM, N.; GAMMELTOFT, S.; BRUNAK, S. Sequence and structure based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. **J Mol Biol** **294**, p.1351–1362, 1999.
- BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. **Manual de Transformação Genética de Plantas**. Brasília:Embrapa. 309p. 1998.

- BRAY, E.A. Molecular responses to water deficit. **Plant Physiology**, v.4, n.103, p.1035-1040, 1993.
- BUCHANAN, B. B.; BALMER, Y. Redox regulation: a broadening horizon. **Annual Review of Plant Biology** **56**, p.187–220, 2005.
- CALERO, M.; WHITTAKER, G.R.; COLLINS, R.N. Yop1p, the yeast homolog of the polyposis locus protein 1, interacts with Yip1p and negatively regulates cell growth. **J Biol Chem** **276**, p.12100–12112, 2001.
- CANTAGALLO, F.S.; AZEVEDO, F.A.; SCHINOR, H.; FILHO, F.A.A.M.; MENDES, B.M.J. Micropropagação de citrumelo = 'swingle' pelo cultivo in vitro de gemas axilares. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, p. 136-138, 2005.
- CERQUEIRA, E. C.; CASTRO NETO, M. T.; PEIXOTO, C. P.; SOARES FILHO, W. dos S.; LEDO, C. A. S., OLIVEIRA, J. G. **Resposta de porta-enxertos de citros ao déficit hídrico**. Revista Brasileira de Fruticultura, v.26, p 515-519, 2004.
- CHEN, C.N.; CHU, C.C.; ZENTELLA, R.; PAN, S.M.; HO, T.H.D. *AtHVA22* gene family in *Arabidopsis*: phylogenetic relationship, ABA and stress regulation, and tissue-specific expression. **Plant Molecular Biology** **49**, p.633–644, 2002.
- CINTRA, F.L.D.C.; LIBARDI, P.L.; SAAD, A.M. Balanço hídrico no solo para porta-enxertos de citros em ecossistema de tabuleiro costeiro. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e ambiental**. v.4, p. 23-28, 2000.
- CHRISTENSEN, A. B.; CHO, B. H.; NAESBY, M.; GREGERSEN, P. L.; BRANDT, J.; MADRIZ-ORDENANA, K.; COLLINGE, D. B.; THORDAL-CHRISTENSEN, H. The molecular characterization of the two barley proteins establishes the novel PR-17 family of pathogenesis-related protein. **Mol. Plant Pathol.** **3**, p.134-144, 2002.
- COLETTA-FILHO, H. D.; TARGON, M. L. P. N.; TAKITA, M. A.; DE NEGRI, J. D.; POMPEU, J.; MACHADO, M. A.JR.; AMARAL, A. M.; MULLER, G. W. First report of the causal agent of huanglongbing (*Candidatus Liberibacter asiaticus*) in Brazil. **Plant Dis** **88**, p.1382, 2004.
- DAMATTA, F.M.; CHAVES, A.R.M.; PINHEIRO, H.A.; DUCATTI, C.; LOUREIRO, M.E. Drought tolerance of two field-grown clones of *Coffea canephora*. **Plant Science**. Vol. 164, pp. 111-117. 2003.
- DAMATTA, F. M. Exploring drought tolerance in coffee: a physiological approach with some insights for plant breeding. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, São Paulo, v. 16, p. 1-6, 2005.
- DAVE, R.S.; MITRA, R.K. A low temperature induced apoplastic protein isolated from *Arachis hypogaea*. **Phytochemistry** **49**, p.2207–2213, 1998.
- DE ANTONI, A.; SCHMITZOVA, J.; TREPTE, H.H.; GALLWITZ, D.; ALBERT, S. Significance of GTP hydrolysis in Ypt1p-regulated endoplasmic reticulum to Golgi transport revealed by the analysis of two novel Ypt1-GAPs. **J Biol Chem** **277**, p.41023–41031, 2002.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus** **12**: 13-15, 1990.

- DONADIO, L.C.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MOREIRA, C.S. Centros de origem, distribuição geográfica das plantas cítricas e histórico da citricultura no Brasil. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico; Fundag, Cap. 1, p. 1-14, 2005.
- DUBOS, C.; PLOMION, C. Drought differentially affects expression of a PR-10 protein in needles of the maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) seedling. **J Exp Bot** **1143**, p.4-52, 2001.
- EASTMOND, P.J.; JONES, R.L. Hormonal regulation of gluconeogenesis in cereal aleurone is strongly cultivar-dependent and gibberellin action involves SLENDER1 but not GAMYB. **Plant J** **44**, p. 483–493, 2005.
- EDREVA, A. Pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years. **Gen Appl Plant Physiol** **31**, p.105–24, 2005.
- EKRAMODDOULLAH, A.K.M.; TAYLOR, D.; HAWKINS, B.J. Characterization of a fall protein of sugar pine and detection of its homologue associated with frost hardiness of western white pine needles. **Can J Forest Res** **1137**; p.25–47, 1995.
- FAO. **Food and Agriculture Organization**. Disponível em: <http://www.faostat.fao.org>. Acesso em: novembro de 2012.
- FERNANDES, H.; PASTERNAK, O.; BUJACZ, G.; BUJACZ, A.; SIKORSKI, M.M.; JASKOLSKI, M. *Lupinus luteus* pathogenesis-related protein as a reservoir for cytokinin. **J Mol Biol** **378**, p.1040–1051, 2008.
- FILNER, P.; VARNER, J.E. A test for de novo synthesis of enzymes: density labeling with H₂O¹⁸ of barley α -amylase induced by gibberellic acid. **Proc Natl Acad Sci USA** **58**, p. 1520–1526, 1967.
- FOYER, C. H.; SHIGEOKA, S. Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. **Plant Physiology** **155**, p.93–100, 2011.
- GESTEIRA, A. S.; MICHELI, F.; CARELS, N.; DA SILVA, A. C.; GRAMACHO, K. P.; SCHUSTER, I.; MACÊDO, J.N.; PEREIRA, G. A. G.; CASCARDO, J. C. M.. Comparative analysis of expressed genes from cacao meristems infected by *Moniliophthora perniciosa*. **Ann. Bot.**, v.23 p. 129-140, 2007.
- GILROY, S., JONES, D.L. Through form to function: root hair development and nutrient uptake. **Trends Plant Sci** **5**, p. 56–60, 2000.
- GMITTER, J.R.; DENG, Z.; CHEN, C. Cloning and characterization of disease resistance genes in Citrus. In: Citrus Genetics, Breeding and Biotechnology. **Kahn, I. H. (Ed.)**, CAB International, Oxfordshire, p. 287-305, 2007.
- GROSSER, J.W.; GMITTER JUNIOR, F.G. Protoplast fusion and citrus improvement. **Plant Breeding Review**, Berlin, v. 8, p. 339-374, 2000.
- GUO, W.J.; HO, T.D. An Abscisic Acid-Induced Protein, HVA22, Inhibits Gibberellin-Mediated Programmed Cell Death in Cereal Aleurone Cells. **Plant Physiology** **147**, p. 1710-1722, 2008.

- HAMILTON, D.A.; HILLS, A.; KÖHLER, B.; BLATT, M.R. Ca²⁺ channels at the plasma membrane of stomatal guard cells are activated by hyperpolarization and abscisic acid. **PNAS**. Vol. 97, pp. 4967–4972. 2000.
- HAMROUNI, I.; SALAH, H.B.; MARZOUK, B. Effects of water-deficit on lipids of safflower aerial parts. **Phytochemistry** **58**, p.277–280, 2001.
- HARB, A.; KRISHNAN A.; AMBAVARAM, M. M. R.; PEREIRA, A. Molecular and physiological analysis of drought stress in *Arabidopsis* reveals early responses leading to acclimation in plant growth. **Plant Physiology** **154**, p.1254–1271, 2010.
- HERMAN, E.M.; LARKINS, B.A. Protein storage bodies and vacuoles. **Plant Cell** **11**, p. 601–614, 1999.
- HINCHA, D.K.; MEINS, F.;SCHMITT,J.M. β -1,3-Glucanase is Cryoprotective in Vitro and Is Accumulated in Leaves during Cold Acclimation. **Plant Physiol.** **14**, p. 1077-1 083, 1997.
- HOFFMANN-SOMMERGRUBER, K. Pathogenesis-related (PR)-proteins identified as allergens. *Biochem Soc Trans* **30**, p. 930–935, 2002.
- HOLTHUIS, J.C.; POMORSKI, T.; RAGGERS, R.J.; SPRONG, H.; VAN MEER, G. The organizing potential of sphingolipids in intracellular membrane transport. **Physiol Rev** **81**, p.1689–1723, 2001.
- HON, W.C.; GRIFFITH, M.; MLYNARZ, A.; KWOK, Y.A.; YANG, D.C.S. Antifreeze proteins in winter rye are similar to pathogenesis-related proteins. **Plant Physiol** **109**, p.879–889, 1995.
- HU, J.; SHIBATA, Y.; VOSS, C.; SHEMESH, T.; LI, Z.; COUGHLIN, M.; KOZLOV, M. M.; RAPOPORT, T. A.; PRINZ, W. A. Membrane proteins of the endoplasmic reticulum induce high-curvature tubules. **Science** **319**, p.1247-1250, 2008.
- HWANG, H.J.; KIM, H.; YU, H.J.; OH, M.H.; LEE, I.; KIM, S.G. Gene encoding pathogenesis-related 10 protein of *Lithospermum erythrorhizon* is responsive to exogenous stimuli related to the plant defense system. **Plant Sci** **1297**, p.1302–165, 2003.
- IBGE- **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, 2013, disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acessado em novembro de 2013.
- IPCC - **Intergovernmental Panel on Climate Change**. Climate change 2001: The Scientific Basis. Cambridge University Press, p. 944, 2001.
- JAIN, S.; KUMAR, D.; JAIN, M.; CHAUDHARY, P.; DESWAL, R.; SARIN, N.B. Ectopic overexpression of a salt stress-induced pathogenesis-related class 10 protein (PR10) gene from peanut (*Arachis hypogaea* L.) affords broad spectrum abiotic stress tolerance in transgenic tobacco. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **109**, p.19–31, 2012.
- JOSHI-SAHA, A.; VALON, C.; LEUNG, J. A brand new START: abscisic acid perception and transduction in the guard cell. **Sci Signal.** 29;4(201):re4. doi: 10.1126/scisignal.2002164, 2011.

- KERBAUY, G.B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 452p, 2004.
- KIM, K. S.; MIN, J. Y.; D, M. B. Oxalic Acid Is an Elicitor of Plant Programmed Cell Death during *Sclerotinia sclerotiorum* Disease Development. **MPMI** Vol. 21, No. 5, p. 605–612, 2008.
- KOHLER, B.; BLATT, M.R. Protein phosphorylation activates the guard cell Ca²⁺ channel and is a prerequisite for gating by abscisic acid. **Plant Journal**. Vol. 32, pp.185–194, 2002.
- KROGH, A. LARSSON, B.; VON, H. G.; SONNHAMMER, E.L.L. Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes. **Journal of Molecular Biology** **305**, p.567-580, 2001.
- LIU, J.-J.; EKRAMODDOULLAH, A.K.M. The family 10 of plant pathogenesis-related proteins: Their structure, regulation, and function in response to biotic and abiotic stresses. **Physiol. Mol. Plant Pathol.** **68**, p.3-13, 2006.
- MACHADO, M. A.; TARGON, M. L. P. N.; COLETTA-FILHO, H. D.; MULLER, G. W. Morte súbita dos citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 25, n. 1, 2004.
- MACROBBIE, E.A.C. ABA activates multiple Ca²⁺ fluxes in stomatal guard cells, triggering vacuolar K⁺(Rb⁺) release. **Plant Biology**. Vol. 97, p. 12361–12368, 2000.
- MAGALHÃES, A.M.; OLIVEIRA, A.C.; SILVEIRA, C.F.; BRAGA, E.J.B.; FONSECA, G.M.; BENITEZ, L.C.; MAIA, L.C.; LUZ, V.K. Ácido abscísico e o estresse. **Embrapa Clima Temperado**. Documentos, 307, p.30, 2010.
- MAHAJAN, S.; TUTEJA, N. Cold, salinity and drought stresses: an overview. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.444, p.139-158, 2005.
- MAPA. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em de 2013.
- MARTINEZ-GODOY, M.A.; MAURI, N.; JUAREZ, J.; MARQUES, M.C.; SANTIAGO, J.; FORMENT, J.; GADEA, J. A genome-wide 20 K citrus microarray for gene expression analysis. **BMC Genomics** **9**, p. 318, 2008.
- MATTOS, JR. D.; DE NEGRI, D. J.; FIGUEIREDO, J.O. **Lima ácida Tahiti**. Campinas: Instituto Agrônômico. Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Citros “Sylvio Moreira”. Campinas, 2003.
- MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico; Fundag, Cap. 1, p. 1-14, 2005.
- MAUREL, C.; VERDOUCQ, L.; LUU, D. T.; SANTONI, V. Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. **Annual Review of Plant Biology** **59**, p.595-624, 2008.
- MEARNS, L.O.; ROSENZWEIG, C.; GOLDBERG, R. Mean and variance change in climate scenarios: methods, agricultural applications, and measures of uncertainty. **Climatic Change** **35**, p. 367–396, 1997.

- MENEZES, S.P.; SANTOS, J.L.; CARDOSO, T.H.S.; PIROVANI, C.P.; FABIENNE MICHELI, F.; NORONHA, F.S.M.; ALVES, A.C.; FARIA, A.M.C. GESTEIRA, A.S. Evaluation of the Allergenicity Potential of TcPR-10 Protein from *Theobroma cacao*. **PLoS ONE**, V. 7, 2012
- MOORE, JP.; VICRÉ-GIBOUIN, M.; FARRANT, J.M.; DRIOUICH, A. Adaptations of higher plant cell walls to water loss: drought end desiccation. **Physiologia Plantarum**. Vol.134, pp. 237-245. 2008.
- MOONS, A.; PRINSEN, E.; BAUW, G.; VAN MONTAGU, M. Antagonistic effects of abscisic acid and jasmonates on salt stress-inducible transcripts in rice roots. **Plant Cell**, v. 9, p. 2243–59. 1997.
- MOREIRA, R.A.; RAMOS, J.D.; CRUZ, M.C.M. Caracterização de frutos e poliembrionia em sementes de ‘flying dragon’ e de híbridos de porta-enxerto de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Vol.32, nº 2, pp.486-492. 2010.
- MURAMOTO Y.; WATANABE, A.; NAKAMURA, T.; TAKABE, T. Enhanced expression of a nuclease gene in leaves of barley plants under salt stress. **Gene**, 234, p.315-21, 1999.
- MURRAY, H.G.; THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular weight DNA. **Nucleic Acids Res** 8, p.4321-4325, 1980.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- MURATA, Y.; PEI, Z.M.; MORI, I.C.; SCHROEDER, J.I. Abscisic acid activation of plasma membrane Ca²⁺ channels in guard cells requires cytosolic NAD(P)H and is differentially disrupted upstream and downstream of reactive oxygen species production in the *abi1-1* and *abi1-2* protein phosphatase 2c mutants. **Plant Cell**. Vol. 13, pp. 2513-2523. 2001.
- MUTHUKRISHNAN, S.; LIANG, G.H.; TRICK, H.N.; GILL, B.S. Pathogenesis relates proteins and their genes in cereals. **Plant Cell Tiss Organ Cult** 64, p. 93–114, 2001.
- MULLER, J.E; WHITSHITT, M.S. Plant cellular responses to water deficit. **Plant Growth Regulation**, v. 20, p. 41-46, 1996.
- NEVES, M. F. **Cadeia da laranja já trouxe mais de R\$ 110 bilhões ao país**. (2010) Disponível em: <<http://www.zecadirceu.com.br/post.php?id=2289>> Acesso em: janeiro de 2014.
- NEVES, D.M. Mecanismos fisiológicos e expressão gênica relacionado à seca em porta-enxertos de citros. 2011. 62 f. **Dissertação** (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2011.
- ORTOLANI, A.; PEDRO JÚNIOR, M.J.; ALFONSI, R.R. Agroclimatologia e o cultivo de citros. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JÚNIOR, J.; AMARO, A.A. (Eds.) **Citricultura Brasileira**. Campinas: Fundação Cargill, p. 153-195, 1991.
- PAIVA, A.Q.; SOUZA, L.S.; RIBEIRO, A.C.; COSTA, L.M. Disponibilidade de água de uma toposequência de solos de tabuleiro do Estado da Bahia e sua relação com os indicadores do crescimento da laranjeira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, n. 3, v.22, p.367-377, 1998.

- PARK, C.J.; KIM, K.J.; SHIN, R.; PARK, J.M; SHIN, Y.C.; PAEK, K.H. Pathogenesis-related protein 10 isolated from hot pepper functions as a ribonuclease in an antiviral pathway. **Plant J** **37**, p. 98-186, 2004.
- PEI, Z-M.; MURATA, Y.; BENNING, G.; THOMINE, S.; KLUSENER, B.; ALLEN, G.J.; GRILL, E.; SCHROEDER, J.I. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signaling in guard cells. **Nature**. Vol. 406, pp. 731–734. 2000.
- PÉREZ-PÉREZ; J.G. ; Robles, J.C.; TOVAR, P.B.. Response to drought and salt stress of lemon ‘Fino 49’ under field conditions: Water relations, osmotic adjustment and gas exchange. **Scientia Horticulturae**, v.122, p. 83–90, 2009.
- PIO, R. M.; FIGUEIREDO, J. O.; STUCHI, E. S.; CARDOSO, S. A. B. Variedades copas. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico; Fundag, Cap. 3, p. 39-60, 2005.
- POMPEU JÚNIOR, J. Porta-Enxertos. In: Mattos JÚNIOR, D. de; NEGRI, J.D. de; PIO, R. M.; POMPEU JÚNIOR, J. (Eds.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico e FUNDAG, p. 61-104, 2005.
- POMPEU JUNIOR, J. Porta-enxertos. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F. C. P.; POMPEU JUNIOR, P.; AMARO, A. A. (Eds.). **Citricultura brasileira**. 2. ed. Campinas: Fundação Cargill, v. 1, p. 265-280, 1991.
- PINHEIRO, H.A.; DAMATTA, F.M.; CHAVES, A.R.M.; LOUREIRO, M.E.; DUCATTI, C. Drought Tolerance is Associated with Rooting Depth and Stomatal Control of Water Use in Clones of *Coffea canephora*. **Annals of Botany**. Vol. 96, pp. 101-108, 2005.
- PINHEIRO, C.; CHAVES, M.M. Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data? **Journal of Experimental Botany**, v. 62, p. 869-882, 2011.
- PINTO, M.P.; RICARDO, C.P.; ALBUS, L.L. pathogenesis-related proteins that show similarity to PR-10 proteins. **Plant Physiol**, **1345**, p.51-109, 1995.
- PNUELI, L.; HALLAK-HERR, E.; ROZENBERG, M.; COHEN, M.; GOLOUBINOFF, P.; KAPLAN, A. Molecular and biochemical mechanisms associated with dormancy and drought tolerance in the desert legume *Retama raetam*. **Plant J** **31**, p.30-319, 2002.
- PUNGARTNIK, C.; SILVA, A. C. ; MELO, S.A.; GRAMACHO, K.P.; CASCARDO, J. C. M.; BRENDEL, M.; MICHELI, F.; GESTEIRA, A.S. High-affinity copper transport and Snq2 export permease of *Saccharomyces cerevisiae* modulate cytotoxicity of PR-10 from *Theobroma cacao*. **Molecular Plant-Microbe Interactions** **22**, p.39-51, 2009.
- RADAUER, C.; LACKNER, P.; BREITENEDER, H. The Bet v I fold: an ancient, versatile scaffold for binding of large, hydrophobic ligands. **BMC Evol Biol**, p.8-286, 2008.
- RAKWAL, R.; AGRAWAL, G.K.; YONEKURA, M. Separation of proteins from stressed rice (*Oryza sativa* L.) leaf tissues by twodimensional polyacrylamide gel electrophoresis: induction of pathogenesis-related and cellular protect proteins by jasmonic acid, UV irradiation and copper chloride. **Electrophoresis** **3472**, p.3478–20, 1999.

- RODRÍGUEZ-GAMIR, J.; PRIMO-MILLO, E.; FORNER, B. J.; FORNERGINER, A. M. Citrus rootstock responses to water stress. **Scientia Horticulturae**. Vol. 126, pp. 95-102, 2010.
- SAMANANI, N.; LISCOMBE, D. K.; FACCHINI, P. J. 2004. Molecular cloning and characterization of norcochlorogenic acid synthase, an enzyme catalyzing the first committed step in benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis. **Plant J.** **40**, p.302-313, 2004.
- SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, **38**, p.995-1014, 2005.
- SCHROEDER, J.I.; ALLEN, G.J.; HUGOUVIEUX, V.; KWAK J.M.; WANER, D. Guard cell signal transduction. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol**. Vol. 52, pp. 627–658, 2001.
- SENTELHAS, P.C. Agrometeorologia dos citros. In: MATTOS JÚNIOR *et al.* (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônomo e Fundag, p. 317-344, 2005.
- SHANER, D. L.; BOYER, J. S. Nitrate reductase activity in maize (*Zea mays* L.) leaves. Regulation by nitrate flux. **Plant Physiology**, Maryland, v.58, p.499-504, 1976.
- SHEN, Q.; CHEN, C.N.; BRANDS, A.; PAN, S.M.; HO, T.H. The stress- and abscisic acid-induced barley gene HVA22: developmental regulation and homologues in diverse organisms. **Plant Mol Biol** **45**, p.327–340, 2001.
- SHEN, Q.; UKNES, S.J.; HO, T.H. Hormone response complex in a novel abscisic acid and cycloheximide-inducible barley gene. **J Biol Chem** **268**, p. 23652–23660, 1993.
- SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, Vol. 58, No. 2, p. 221–227, 2007.
- SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. **Current Opinion in Plant Biology**, vol. 3, p. 217-223, 2000.
- SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SEKI, M. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. **Current Opinion in Plant Biology** **6**, p. 410–417, 2003.
- SINGH, S.; RAJAM, M. V. Citrus biotechnology: Achievements, limitations and future directions. **Physiology and Molecular Biology of Plants**. V.15,p.3-22., 2009.
- SOUZA, L.D.; SOBRINHO, A. P. C.; RIBEIRO, L.S.; SOUZA, L.S.; LEDO, C.A.S. Avaliação de plantas cítricas, em diferentes profundidades de plantio, em Latossolo Amarelo dos Tabuleiros Costeiros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.26, n.2, p.241-244, 2004.
- SPARKES, I.A.; FRIGERIO, L.; TOLLEY, N.; HAWES, C.. The plant endoplasmic reticulum: a cell-wide web. **Biochemical Journal** **423**, p.145–155, 2009.
- SPARKES, I.; TOLLEY, N.; ALLER, I.; SVOZIL, J.; OSTERRIEDER, A.; BOTCHWAY, S.; MUELLER, C.; FRIGERIO, L.; HAWES, C. Five Arabidopsis reticulon isoforms share endoplasmic reticulum location, topology, and membrane-shaping properties. **Plant Cell** **22**, p.1333-1343,2010.

- SU, J.; SHEN,Q.; HO,T.H.D.; WU, R. Dehydration-stress-regulated transgene expression in stably transformed rice plants. **Plant Physiol.** **117**, p.913–922, 1998.
- SWINGLE, W.T.; REECE, R. C. The botany of Citrus and its wild relatives. In: REUTHER, W.; BATCHELLOR, L.D.; WEBER, H.J. (Ed.). The citrus industry. **Berkeley: University of California**, p. 190-430, 1967.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3 ed. São Paulo: Artmed, 2003. 720p.
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 1596 - 1599. 2007.
- TEZARA, W.; MARTÍNEZ, D.; RENGIFO, E.; HERRERA, A. Photosynthetic Responses of the Tropical Spiny Shrub *Lycium nodosum* (Solanaceae) to Drought, Soil Salinity and Saline Spray. **Annals of Botany**, v. 92, p. 757-765, 2003.
- THOMPSON, J. D.; HIGGENS, D. G.; GIBSON, T. J.; CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.
- THORDAL-CHRISTENSEN H.; ZHANG Z.; WEI, Y.; COLLINGE, D. B. Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley–powdery mildew interaction. **Plant Journal** **11**, p.1187–1194, 1997.
- TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. **Embrapa-CNPq**, Brasília, 1998.
- TOLLEY, N.; SPARKES, I.A.; HUNTER, P.R.; CRADDOCK, C.P.; NUTTALL, J.; ROBERTS, L. M.; HAWES, C.; PEDRAZZINI, E.; FRIGERIO, L. Overexpression of a plant reticulon remodels the lumen of the cortical endoplasmic reticulum but does not perturb protein transport. **Traffic** **9**, p.94-102, 2008.
- UKAJI, N.; KUWABARA, C.; TAKEZAWA, D.; ARAKAWA, K.; FUJIKAWA, S. Accumulation of pathogenesis-related (PR) 10/Bet v 1 protein homologues in mulberry (*Morus bombycis* Koidz.) tree during winter. **Plant Cell Environ** **27**, p. 21- 1112, 2004.
- UMEZAWA, T.; FUJITA, M.; FUJITA, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes unlock the future. **Current Opinion in Biotechnology** **17**, p. 113–122, 2006a.
- VALLIYODA, B.; NGUYEN H.T. Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v.9, p.189–195, 2006.
- VAN LOON, L. C.; VAN SERIEN, E.A. The family of pathogenesis related proteins. **Physiol. Mol. Plant Pathol.** **55**, p.85-97, 1999.
- VAN LOON, L. C.; PIERPOINT, W. S.; BOLLER, T.; CONEJERO, V. Recommendation for naming plant pathogenesis-related proteins. **Plant Mol. Biol. Rep.** **12**, p.245-264, 1994.
- VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C.M. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annu. Rev. Phytopathol.** **44**, p. 135-162 2006.

- VIANA, M. M.; BRAGA, D. **Cenário continua positivo em 2008**. Hortifrutibrasil, Piracicaba, dez. 2007. Disponível em: <http://www.cepea.esalq.usp.br/hfbrasil/edicoes/64/citros.pdf>. Acesso em: 10 de janeiro de 2014.
- VIEIRA, D.G. **Irrigação de citros**. In: Rodriguez, O.; Viegas, F.; Pompeu Júnior, J.; Amaro, A. A. *Citricultura Brasileira*, 2 ed. Campinas: Fundação Cargill, p. 519-541, 1991.
- VITALE, A.; HINZ, G. Sorting of proteins to storage vacuoles: how many mechanisms? **Trends Plant Sci** **10**: p. 316–323, 2005.
- VOELTZ, G.K.; PRINZ, W.A.; SHIBATA, Y.; RIST, J.M.; RAPOPORT, T.A. A class of membrane proteins shaping the tubular endoplasmic reticulum. **Cell** **124**, p. 573–586, 2006.
- WALTER, M. H.; LIU, J.-W.; GRAND, C.; LAMB, C. J.; HESS, D. Bean pathogenesis-related (PR) proteins deduced from elicitor-induced transcripts are members of a ubiquitous new class of conserved PR proteins including pollen allergens. **Mol. Gen. Genet.** **222**, p.353-360,1990.
- WANG, L.; DU, Y.; LU, M.; LI, T. ASEB: a web server for KAT-specific acetylation site prediction. **Nucleic Acids Research**, 2012.
- WISNIEWSKI, M.; BASSETT, C.; ARORA, R. Distribution and partial characterization of seasonally expressed proteins in different aged shoots and roots of ‘Loring’ peach (*Prunus persica*). **Tree Physiol** **339**, p.24–45, 2004.
- YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Organization of cisacting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. **Trends in Plant Science** **10**, p. 88–94, 2005.
- YANG, X.; MATERN, H.T.; GALLWITZ, D. Specific binding to a novel and essential Golgi membrane protein (Yip1p) functionally links the transport GTPases Ypt1p and Ypt31p. **EMBO J** **17**, p.4954–4963, 1998.
- ZIADI, S.; POUPARD, P.; BRISSET, M.N.; PAULIN, J. P.; SIMONEAU, P. Characterization in apple leaves of two subclasses of PR-10 transcripts inducible by acibenzolar-S-methyl, a functional analogue of salicylic acid. **Physiol. Mol. Plant Pathol.** **59**, p. 33-43, 2001.
- ZHANG, J.Z.; CREELMAN, R.A.; ZHU, J.K. From laboratory to field. Using information from *Arabidopsis* to engineer salt, cold, and drought tolerance in crops. **Plant Physiology** **135**, p. 615–621, 2004.
- ZHANG, X.; ZHANG, L.; DONG, F.; GAO, J.; GALBRAITH, D.W.; SONG, C-P. Hydrogen peroxide is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. **Plant Physiology**. Vol. 126, p. 1438–1448. 2001.
- ZHANG, Z.; COLLINGE, D.B.; THORDAL-CHRISTENSEN, H. Germin-like oxalate oxidase, a H₂O₂-producing enzyme, accumulates in barley attacked by the powdery mildew fungus. **Plant J** **8**, p.139–45, 1995.

9. ANEXOS

Anexo 1. Mapa de restrição do gene *HVA22*

Table by Enzyme Name

Enzyme name	No. cuts	Positions of sites	Recognition sequence
Acc113I	1	305	agt/act
AciI	2	313 346	ccgc
AcsI	1	93	r/aatty
AfaI	4	254 289 305 388	gt/ac
AgeI	1	261	a/ccggt
AluI	1	300	ag/ct
Alw21I	1	500	gwgw/c
ApoI	1	93	r/aatty
AspHI	1	500	gwgw/c
AspS9I	1	124	g/gncc
AsuI	1	124	g/gncc
BanII	1	181	grgcy/c
BbsI	1	434	gaagac
Bbv12I	1	500	gwgw/c
Bbv16II	1	434	gaagac
BbvI	1	142	gcagc
BcgI	1	425	cgannnnntgc
BfaI	2	301 307	c/tag
BmyI	2	181 500	gdgch/c
BpiI	1	434	gaagac
BpuAI	1	434	gaagac
BsaBI	1	407	gatnn/nnatc
BsaWI	1	261	w/ccggw
Bsc4I	1	489	ccnnnn/nngg
Bse118I	1	261	r/ccggy
BseI	3	131 443 449	actgg
Bse8I	1	407	gatnn/nnatc
BseNI	3	131 443 449	actgg
BseRI	1	397	gaggag
Bsh1365I	1	407	gatnn/nnatc
BsiHKAI	1	500	gwgw/c
BsiI	1	504	ctcgtg
BsiSI	1	262	c/cgg
BsiYI	1	490	ccnnnnn/nngg
BslI	1	490	ccnnnnn/nngg
BsoFI	3	139 311 344	gc/ngc
Bsp1286I	2	181 500	gdgch/c
Bsp143I	2	98 402	/gatc
BsrBRI	1	407	gatnn/nnatc
BsrFI	1	261	r/ccggy
BsrI	3	131 443 449	actgg
BsrSI	3	131 443 449	actgg

BssAI	1	261					r/ccggy
BssSI	1	504					ctcgtg
Bst71I	1	142					gcagc
BstDEI	2	33 245					c/tnag
BstF5I	1	196					ggatg
BstSFI	1	48					c/tryag
BsuRI	1	126					gg/cc
Cac8I	1	209					gcn/ngc
Cfr10I	1	261					r/ccggy
Cfr13I	1	124					g/gncc
Csp6I	4	253 288 304 387					g/tac
CviJI	6	126 179 207 300 318 346					rg/cy
DdeI	2	33 245					c/tnag
DpnI	2	100 404					ga/tc
DpnII	2	98 402					/gatc
Eco24I	1	181					grgcy/c
Eco255I	1	305					agt/act
EcoT22I	1	159					atgca/t
FokI	1	196					ggatg
FriOI	1	181					grgcy/c
Fsp4HI	3	139 311 344					gc/ngc
HaeIII	1	126					gg/cc
HapII	1	262					c/cgg
HinfI	2	2 81					g/antc
HpaII	1	262					c/cgg
HphI	1	298					ggtga
Hsp92II	1	317					catg/
ItaI	3	139 311 344					gc/ngc
Kzo9I	2	98 402					/gatc
MaeI	2	301 307					c/tag
MamI	1	407					gatnn/nnatc
MboI	2	98 402					/gatc
MboII	2	434 490					gaaga
MfeI	1	170					c/aattg
MnlI	3	341 395 505					cctc
Mph1103I	1	159					atgca/t
MspI	1	262					c/cgg
MunI	1	170					c/aattg
MwoI	2	324 381					gcnnnnn/nngc
NdeII	2	98 402					/gatc
NlaIII	1	317					catg/
NsiI	1	159					atgca/t
PalI	1	126					gg/cc
PinAI	1	261					a/ccggt
PleI	1	85					gagtc
Ppu10I	1	155					a/tgcat
RsaI	4	254 289 305 388					gt/ac
Sau3AI	2	98 402					/gatc
Sau96I	1	124					g/gncc
ScaI	1	305					agt/act
SduI	2	181 500					gdgch/c
SfaNI	4	139 161 418 424					gcatc
SfcI	1	48					c/tryag
Sse9I	4	93 170 281 377					/aatt
TfiI	1	2					g/awtc
Tsp509I	4	93 170 281 377					/aatt
TspEI	4	93 170 281 377					/aatt
TspRI	3	39 206 448					cagtg
Zsp2I	1	159					atgca/t

The following endonucleases were selected but don't cut this sequence:

AatI, AatII, AccI6I, Acc65I, AccBII, AccB7I, AccBSI, AccI, AccII, AccIII, AclNI, AclWI, AcyI, AfeI, AflIII, AflIII, AhdI, Alw26I, Alw44I, AlwI, AlwNI, Ama87I, AocI, Aor51HI, ApaI, ApaLI, AscI, AseI, AsnI, Asp700I, Asp718I, AspEI, AspI, AspLEI, AtsI, AvaI, AvaII, AviII, AvrII, BalI, BamHI, BanI, BanIII, BbeI, BbiII, BbrPI, BbuI, BclI, BcnI, BcoI, BfrI, BglI, BglII, BlnI, BlpI, Bme18I, BpmI, Bpu102I, Bpu14I, Bsa29I, BsaAI, BsaHI, BsaI, BsaJI, BsaMI, BsaOI, BscI, Bse21I, BseAI, BseCI, BseDI, BsePI, BsgI, Bsh1236I, Bsh1285I, BshNI, BsiEI, BsiMI, BsiWI, BsmAI, BsmBI, BsmFI, BsmI, BsoBI, Bsp106I, Bsp119I, Bsp120I, Bsp13I, Bsp1407I, Bsp143II, Bsp1720I, Bsp19I, Bsp68I, BspCI, BspDI, BspEI, BspHI, BspLU11I, BspMI, BspTI, BspXI, BsrBI, BsrDI, BsrGI, BssHII, BssT1I, Bst1107I, Bst2UI, Bst98I, BstBI, BstD102I, BstDSI, BstEII, BstH2I, BstI, BstMCI, BstNI, BstOI, BstPI, BstSNI, BstUI, BstX2I, BstXI, BstyI, BstZI, Bsu15I, Bsu36I, CciNI, CelII, CfoI, Cfr42I, Cfr9I, CfrI, ClaI, CpoI, Csp45I, CspI, CvnI, DraI, DraII, DraIII, DrdI, DsaI, EaeI, EagI, Eam1104I, Eam1105I, EarI, Ecl136II, EclHKI, EclXI, Eco105I, Eco130I, Eco147I, Eco31I, Eco32I, Eco47I, Eco47III, Eco52I, Eco57I, Eco64I, Eco72I, Eco81I, Eco88I, Eco91I, EcoICRI, EcoNI, EcoO109I, EcoO65I, EcoRI, EcoRII, EcoRV, EcoT14I, EheI, ErhI, Esp1396I, Esp3I, FauI, FauNDI, FbaI, FseI, FspI, GsuI, HaeII, HgaI, HgiEI, HhaI, HlnI, Hln6I, HlnP1I, HincII, HindII, HindIII, HpaI, Hsp92I, HspAI, KasI, Kpn2I, KpnI, Ksp22I, Ksp632I, KspI, LspI, MaeII, MaeIII, MflI, MluI, MluNI, MroI, MroNI, MscI, MseI, MslI, Msp17I, MspAI, MspCI, MspR9I, Mva1269I, MvaI, MvnI, NaeI, NarI, NciI, NcoI, NdeI, NgoAIV, NgoMI, NheI, NlaIV, NotI, NruI, NspBII, NspI, NspV, PacI, PaeI, Paer7I, Pfl123II, PflMI, Ple19I, PmaCI, Pme55I, PmeI, PmlI, PpuMI, PshAI, PshBI, Psp124BI, Psp1406I, Psp5II, PspAI, PspALI, PspEI, PspLI, PspN4I, PspOMI, PstI, PstNHI, PvuI, PvuII, RcaI, RsrII, SacI, SacII, SalI, SapI, SbfI, ScrFI, SexAI, SfiI, Sfr274I, Sfr303I, SfuI, SgfI, SgrAI, SinI, SmaI, SmiI, SnaBI, SpeI, SphI, SplI, SrfI, Sse8387I, SseBI, SspBI, SspI, SstI, SstII, StuI, StyI, SunI, SwaI, TaqI, ThaI, TruI, Tru9I, Tsp45I, Tth111I, TthHB8I, Van91I, Vha464I, VneI, VspI, XbaI, XcmI, XhoI, XhoII, XmaI, XmaIII, XmnI.